

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**ATIVIDADE NEUROFARMACOLÓGICA DO PERICARPO DOS
FRUTOS DE *Passiflora edulis* VARIEDADE *flavicarpa* DEGENER
(MARACUJÁ) EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DE
FLAVONOIDES C-GLICOSÍDEOS**

LIGIA MOREIRAS SENA

**FLORIANÓPOLIS – SC
2009**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

S474a Sena, Ligia Moreiras

Atividade neurofarmacológica do pericarpo dos frutos
de *Passiflora edulis* variedade flavicarpa Degener
(maracujá) em camundongos [tese] : envolvimento de
flavonoides C-glicosídeos / Ligia Moreiras Sena ;
orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima. -
Florianópolis, SC, 2009. n.º f.: 145

1 v: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui bibliografia

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**ATIVIDADE NEUROFARMACOLÓGICA DO PERICARPO DOS
FRUTOS DE *Passiflora edulis* VARIEDADE *flavicarpa* DEGENER
(MARACUJÁ) EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DE
FLAVONOIDES C-GLICOSÍDEOS**

LIGIA MOREIRAS SENA

**Tese de Doutorado apresentada ao curso
de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof^a. Dra. Thereza
Christina Monteiro de Lima**

**Co-orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo
Schenkel**

**FLORIANÓPOLIS – SC
2009**

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho e tudo o que ele representa àqueles que
amo profundamente e que nunca deixarei de amar.**

**Meu pai, Lau.
Minha mãe, Fátima.
Minhas irmãs Lívia, Lenita e Silmara (*in memoriam*).**

HOMENAGEM

**Este trabalho homenageia aqueles que têm feito dos seus trabalhos
e de suas vidas, os trabalhos e vidas de tantos outros.**

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro De Lima

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Profa. Dra. Silvana Zucolotto Langassner

AGRADECIMENTOS

Aos financiadores deste trabalho, que o tornaram possível:

- **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de doutorado concedida à aluna ao longo desses quatro anos, sem a qual não seria possível sua realização.
- **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida à aluna nos primeiros meses do doutorado.
- **FAPESC** (Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica no Estado de Santa Catarina), pela concessão de financiamento que permitiu a compra de material necessário.
- **DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**, por ter me aceito como aluna de pós-graduação e permitido, assim, a utilização de seu espaço, recursos e conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos professores que, de alguma forma, estiveram envolvidos em minha formação e nesta tese de doutorado.

- Aos professores **Drs. Giles Alexander Rae, André de Ávila Ramos e Gina Strufaldi Morato**, membros da comissão de seleção de alunos de doutorado em novembro/2005, por terem acreditado que eu faria um bom trabalho.

- Ao Prof. **Dr. Flavio Henrique Reginatto**, pela contribuição indispensável a este trabalho de doutorado, por compartilhar o seu conhecimento sobre as Passifloras, pelo auxílio tão prestimoso em tantos momentos. Mais que isso, por ter se tornado um amigo com o qual pretendo trabalhar em parceria no futuro.

- Aos professores **Drs. Jamil Assreuy, Rui Daniel Schröder Prediger, Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e André de Ávila Ramos**, pela disponibilidade em participar da banca de qualificação desta tese e pelas valiosas contribuições feitas.

- Ao Prof. **Dr. Antonio de Pádua Carobrez**, pelo empréstimo de algumas drogas utilizadas nesta tese de doutorado e pela discussão promovida na disciplina “Neurobiologia da Ansiedade”.

- Ao Prof. **Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**, pelo empréstimo do composto WAY-100635, sem o qual a última parte da tese não poderia ter sido realizada e que o emprestou mesmo sendo a única quantidade de que dispunha.

AGRADECIMENTOS

Porque eu aprendi, mais do que qualquer época da minha vida, que ninguém pode construir uma vida feliz sozinho...

Porque eu aprendi que a vida só tem sentido por eles...

Porque eu aprendi que, quando eles estão por perto, tudo parece mais fácil e leve...

Porque eu aprendi que AMIZADE é o bem mais valioso que existe e que AMIGO é o maior título que se pode obter.

Porque eles são o meu porto, meu apoio e minha inspiração.

E porque sou feliz de tê-los por perto, mesmo que estejam fisicamente longe.

Aos meus amigos, sem os quais esse trabalho não teria sido feito com a alegria que foi.

Obrigada é pouco...

Ao **meu pai**, parceirão de vida, confidente, amigo, apoio, amor, que me ama tanto e se preocupa tanto comigo. Por ter vindo pra ficar mais perto. Por ter sempre uma palavra de motivação. Por ser um ombro amigo. Por estar sempre do meu lado, incondicionalmente. Por ser o meu melhor amigo. Sempre. Obrigada, pai. Eu não conseguiria se você não estivesse comigo. Essa tese é nossa.

A minha irmã **Lenita**, minha quase-gêmea, por ser tão carinhosa e me apoiar em tantas situações. A saudade que eu sinto não cabe aqui...

À professora **Thereza Christina Monteiro De Lima**, que foi muito mais do que uma orientadora. Foi minha amiga, minha conselheira, segurou as minhas ondas, acreditou em mim desde o primeiro telefonema, me apoio, incentivou, confiou na minha capacidade, me abriu muitas portas, foi uma grande amiga que quero levar para a vida. Obrigada, Thereza, por todo o seu carinho.

A **Silvana Zucolotto Langassner**. Dava pra fazer uma lista com tudo o que tenho pra te agradecer. Os extratos, as cromatografias e os flavonoides, no final, é o menos importante de tudo. Mais valioso mesmo é a sua amizade, seu companheirismo, suas palavras de incentivo, seu apoio emocional, sua mão sempre estendida, seu bom-

humor, tudo o que te faz esse amiga tão querida. Obrigada por tudo, Sil.
E PARABÉNS POR SER A NOVA PROFESSORA DA UFRN!

Aos amigos do grupo de pesquisa de atividade biológica de produtos naturais (Laboratórios de Farmacognosia e Química Farmacêutica): **Didi, Cacá, Karen, Cíntia, Bel, Fernanda, Vanessa, Carize e Virgínia**, por toda a ajuda que me deram nesses quatro anos e por terem se tornado esses parceiros sensacionais que são. E, também, por terem concedido a mim o Prêmio “See The Door” de Micos em Congressos.

Ao amigo **Geison Modesti Costa** (Didi) pelas parcerias em cursos do SEPEX e em outras empreitadas acadêmicas, e por ser o mentor do Prêmio “Camomila” de Comédias em Congressos.

À amiga **Andressa Córneo Gazola**, pelos materiais produzidos para os cursos no SEPEX, pela ajuda em laboratório, pelas dúvidas tiradas e, principalmente, por ser uma amiga tão querida e carinhosa.

A minha querida amiga **Débora Lückemeyer**, que estive do meu lado em momentos bons e difíceis, por sempre me acolher com um abraço caloroso e uma palavra amiga. Obrigada por tudo, tudo, tudo, minha querida.

À **Ana Paula Costa**. Por ser a minha primeira aluna de IC com monografia defendida, por ser uma grande parceira de experimentos – sem a qual a tese não teria sido tão bem concluída –, por aguentar, com garra, minhas teimosias laboratoriais, por ser uma pessoa tão amorosa e por ter se tornado essa grande amiga que se tornou. Obrigada, Ana, sem você eu não teria conseguido esse final de tese.

À **Rafinha Parisoto**, querida aluna e amiga, pela ajuda nos experimentos do início do doutorado e pela amizade tão doce e leve.

Aos amigos e parceiros de estripulias científicas **Gilliard Lach** e **Bianca Romanó de Orte**, pela amizade construída nesses anos. Bibi, obrigada por todas aquelas outras coisas que eu sempre te agradeço e que você sempre diz que não precisa... Você é uma amiga muito querida.

Ao amigo Dr. **Filipe Silveira Duarte**, pelo carinho, amizade, disponibilidade em nos ajudar sempre, amabilidade, e por compartilhar com todos do Laboratório de Neurofarmacologia todo o conhecimento que vem construindo ao longo desses anos de pesquisa. Obrigada, Filipe, por toda a ajuda de tantos momentos.

Aos amigos e parceiros de trabalho **Marcelo Duzzioni** e **Alexandre Hoeller** pela ajuda em muitos momentos desta tese mas, principalmente, por tornarem nosso ambiente de trabalho tão divertido e alto-astral. **Alexandre**: obrigada pelo envio de tantos artigos e pela ajuda na estatística. **Marcelo**: obrigada pelos conselhos científicos e pelas discussões serotoninérgicas!

À **Rebeca Marques de Carvalho**, pela ajuda na pesquisa, pela sugestão de artigos, pelo cuidado com nosso biotério e com a ordem do Laboratório e pelo profissionalismo que sempre teve. Mas, também, por ter se tornado uma pessoa próxima de todos e ter sempre uma palavra de incentivo e apoio.

Aos alunos de IC do Laboratório de Neurofarmacologia: **Ismael, Saulo, Leandro e Nayana**, que trouxeram alegria, amizade e dedicação, em diferentes momentos, ao nosso Laboratório. Ao Ismael: obrigada por tudo, parceiro. Sem você, não haveria início de tese!

À **Diana Lenzi**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela ajuda técnica precisa de sempre mas, principalmente, por ter se tornado uma amiga e ter sempre uma palavra de incentivo. Obrigada, Santidade, essa Eminência aqui agradece.

A todos os amigos do Departamento de Farmacologia, pelo ambiente de amizade e descontração criados em tantos momentos. Especialmente ao pessoal do Laboratório do Prof. Pádua, Laboratório do Prof. Reinaldo, Laboratório do Prof. Rogério, Laboratório do Prof. Rui e Laboratório do Prof. André Ramos.

Em especial, às amigas: **Maria** (que começou Martins e depois se tornou Martins de Castro), **Lucia, Taty e Vanessa**, por ter me dado apoio num momento tão difícil, pelo companheirismo e alegria que encheram minha vida e fizeram do momento difícil uma coisa mais leve... Obrigada, queridas.

À minha amiga tão querida **Elayne Pereira**. Aqui cabia uma lista também. Amiga, companheira, conselheira, confidente, parceira de trabalho e de vida, uma pessoa que eu trouxe, sem saber, lá de Ribeirão e que foi me procurar quando soube que eu estava aqui. Por começar a me ensinar o que é amizade de verdade. Obrigada, minha grande amiga. Por tudo e mais um pouco.

Aos meus tios **Lairton e Nina**, por terem me acolhido na primeira vez que estive em Florianópolis, para a realização das provas de seleção do doutorado, e por se fazerem presentes.

À **Cecília Bianconi Acosta**, minha “mãe” em Florianópolis. Por me ensinar tanta coisa sobre a vida, por ter sempre um abraço carinhoso e uma palavra amiga, por tantos almoços de conversa, por ter me adotado como filha postíça. Sem sua amizade e carinho, tudo teria sido mais difícil.

À **Rita Maria**, secretária do Departamento de Farmacologia, pelo profissionalismo e precisão nos detalhes, pela amizade e pelas conversas divertidas dos cafezinhos.

Ao **Mario Dias**, meu parceiro no início da vida em Florianópolis. Por ter estado do meu lado em grande parte desta tese, pelo apoio que me deu na realização do meu sonho, por me incentivar em horas de cansaço e, por que não, por ter sido o meio pelo qual acabei vindo para esta cidade que com tanto amor me recebeu. Obrigada Mario. Você foi muito querido por mim. Valeu a parceria e tudo o que vivemos aqui.

A **Patrizia Chippari**, por ter nos acolhido tão carinhosamente quando chegamos em Floripa e por ter sido uma parceira memorável de conversas, risadas, vinhos, comidas, crises e outras coisas fantásticas de um quarteto que riu muito junto.

Ao meu amigo-irmão-parceiro de tantos anos, **Otávio Flausino Jr.**, o meu amigo Tatá. Por ter-se feito presente mesmo de longe. Por me aconselhar e segurar minhas ondas tantas e tantas vezes. Por me fazer rir tanto e entender tudo o que eu penso. Por ser tão querido, tão amigo, tão surpreendentemente cúmplice e com quem quero andar sempre na vida. Mesmo que estejamos longe.

Às amigas **Lize** (que reencontrei de Fernando de Noronha) e **Shirley**, que me apoiaram em um momento tão delicado e que, mesmo a vida levando pra mais longe, estão sempre por perto, dentro do meu coração.

Às novas amigas **Lilian Schmeil** (a Lili!) e **Sandra Martins** (a Sandrar), que apareceram na minha nova-vida com tanto carinho e que são tão divertidas, amigas e parceiras.

Aos meus queridos amigos **Sheila, Fabinho e Caetano**, por tornarem minha vida em Florianópolis mais doce. Obrigada, minha amiga, por ter estado ao meu lado, me apoiando e motivando, num momento tão delicado. Obrigada pelas palavras doces e carinhosas e por permitir que o Caetano fizesse parte da minha vida aqui... Adoro vocês.

Às queridas amigas do vôlei, com quem me diverti e suei tanto. Em especial às amigas **Cleci e Tati**, que tanto apoio me deram na vida, no trabalho e no esporte. Obrigada, minhas queridas.

Ao pessoal do Departamento de Fisiologia, por terem acreditado em mim e me dado a maravilhosa oportunidade de ser professora na mesma universidade em que fiz meu doutorado. Em especial, ao Prof. Dr. **Washington Portela de Souza** pela orientação e apoio em minhas atividades docentes.

Aos alunos dos diferentes cursos de graduação para os quais pude dar aula de Fisiologia, na Universidade Federal de Santa Catarina, que me deram tanta alegria e satisfação.

Para o final, guardei o agradecimento para duas pessoas sem as quais, com toda a certeza, eu não teria conseguido terminar esta tese. Eles estiveram comigo nos momentos mais conturbados, mais difíceis, e também mais felizes. Eles foram meus amigos, meus irmãos, meus braços e pernas. Acreditaram em mim. Viraram madrugadas comigo, enquanto eu escrevia. Fizeram comidinhas e trocaram minhas lágrimas por sorrisos. Não me deixaram só. No mais amplo sentido... Eles cuidaram de mim, me ensinaram a ciência do amor incondicional e da amizade. Fizeram-me crer que o ser humano pode ser cada dia melhor e encheram minha vida de alegria, amor e carinho. Nós, juntos, somos o

Trio Mocotó. Ou Caramelo, Biscoito e Chocolate! Eles mudaram minha vida, da melhor maneira possível, e por isso sou grata para sempre. *“Mas, amigo, se em ti penso um momento / Vão-se as perdas e acaba o sofrimento”* (Shakespeare).

Para **Vanessa Schultz e Chico Caprario**, todo o meu amor e amizade. Que nenhum “obrigado” conseguirá agradecer... E à pequena **Maria Rosa Schultz e Silva**, que tem sido a alegria dos meus dias, um cheiro no cangote e uma beijoca bem gostosa!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
FIGURA 1	Fotografias da espécie <i>Passiflora edulis</i> variedade <i>flavicarpa</i> .	9
FIGURA 2	Delineamento experimental do presente trabalho.	34
FIGURA 3	Delineamento experimental da padronização do teste da hipertermia induzida por estresse.	36
FIGURA 4	Delineamento experimental da investigação dos efeitos de diferentes partes de <i>P. edulis</i> no teste da hipertermia induzida por estresse.	37
FIGURA 5	Procedimento de medição da temperatura retal utilizado no teste da hipertermia induzida por estresse.	38
FIGURA 6	Delineamento experimental da investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste do sono induzido por éter etílico.	39
FIGURA 7	Teste do sono induzido por éter etílico.	40
FIGURA 8	Delineamento experimental da investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste das convulsões induzidas por PTZ.	41
FIGURA 9	Teste das convulsões induzidas por PTZ.	41
FIGURA 10	Delineamento experimental da investigação dos efeitos do EA, FB, FAR, isoorientina e FF obtidos a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da transição claro-escuro.	43
FIGURA 11	Delineamento experimental dos experimentos de investigação do envolvimento do sistema GABA-benzodiazepínico e serotoninérgico no efeito da isoorientina no teste da transição claro-escuro.	43

FIGURA 12	Aparatos utilizados no teste da transição claro-escuro e do campo aberto.	44
FIGURA 13	Delineamento experimental da investigação dos efeitos de EA, FB, FAR, isoorientina e FF obtidos a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da suspensão pela cauda.	46
FIGURA 14	Delineamento experimental da investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico no possível efeito da isoorientina no teste da suspensão pela cauda.	46
FIGURA 15	Delineamento experimental da investigação do sistema noradrenérgico no efeito da isoorientina no teste da suspensão pela cauda.	46
FIGURA 16	Teste da suspensão pela cauda.	47
FIGURA 17	Efeitos de diferentes vias de administração e diferentes tratamentos sobre a temperatura retal dos animais no teste da hipertermia induzida por estresse.	52
FIGURA 18	Efeitos do tratamento por via oral com o EA do pericarpo de <i>P. edulis</i> sobre a hipertermia induzida por estresse.	54
FIGURA 19	Efeitos do tratamento por via oral com o suco dos frutos de <i>P. edulis</i> sobre a hipertermia induzida por estresse.	56
FIGURA 20	Efeitos do tratamento por via oral com o EA das folhas de <i>P. edulis</i> sobre a hipertermia induzida por estresse.	58
FIGURA 21	Efeitos do tratamento por via oral com o EA das raízes de <i>P. edulis</i> sobre a hipertermia induzida por estresse.	60
FIGURA 22	Efeitos do tratamento por via oral com o EA do pericarpo de <i>P. edulis</i> sobre o tempo de sono induzido por éter etílico.	62
FIGURA 23	Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de <i>P. edulis</i> sobre as convulsões induzidas por PTZ.	64
FIGURA 24	Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da transição claro-escuro.	66

FIGURA 25	Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste do campo aberto.	67
FIGURA 26	Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da suspensão pela cauda.	69
FIGURA 27	Efeitos do tratamento oral com FB e FAR do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da transição claro-escuro.	71
FIGURA 28	Efeitos do tratamento oral com FB e FAR do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste do campo aberto.	72
FIGURA 29	Efeitos do tratamento oral com FB e FAR do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da suspensão pela cauda.	74
FIGURA 30	Efeitos do tratamento oral com isoorientina e FF obtidas a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da transição claro-escuro.	76
FIGURA 31	Efeitos do tratamento oral com isoorientina e FF obtidas a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste do campo aberto.	77
FIGURA 32	Efeitos do tratamento oral com isoorientina e FF obtidas a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da suspensão pela cauda.	79
FIGURA 33	Efeitos do pré-tratamento com flumazenil nos efeitos da isoorientina isolada a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i> nos testes da transição claro-escuro e do campo aberto.	81
FIGURA 34	Efeitos do pré-tratamento com WAY-100635 nos efeitos da isoorientina isolada a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i> nos testes da transição claro-escuro e do campo aberto.	83
FIGURA 35	Efeitos do pré-tratamento com <i>p</i> -clorofenilalanina nos efeitos do tratamento oral com isoorientina isolada a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i> no teste da suspensão pela cauda.	85
FIGURA 36	Efeitos do pré-tratamento com prazosin nos efeitos da isoorientina isolada a partir do	87

pericarpo de *P. edulis* no teste da
suspensão pela cauda.

SUMÁRIO

		Página
1	INTRODUÇÃO	
1.1	Plantas medicinais neurofarmacologicamente ativas	3
1.2	Plantas “calmantes”, “tranquilizantes” ou ansiolíticas: o gênero <i>Passiflora</i> e a espécie <i>Passiflora edulis</i> variedade <i>flavicarpa</i> Degener	8
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Animais	29
3.2	Material vegetal	29
3.3	Obtenção dos extratos, fracionamento, identificação e isolamento dos compostos	29
3.3.1	Obtenção dos extratos aquosos das raízes, folhas e do suco dos frutos de <i>P. edulis</i>	30
3.3.2	Obtenção do extrato e frações do pericarpo dos frutos de <i>P. edulis</i>	30
3.3.3	Análise qualitativa do extrato e frações do pericarpo dos frutos de <i>P. edulis</i>	30
3.3.4	Processo de obtenção da isoorientina isolada e da fração sem isoorientina	31
3.4	Drogas e soluções	32
3.5	Delineamento experimental	33
3.6	Testes farmacológicos	35
3.6.1	Teste da Hipertermia Induzida por Estresse em Animais Isolados	35
3.6.1.1	Padronização	35
3.6.1.2	Investigação dos efeitos dos extratos vegetais sobre a HIE	37
3.6.2	Teste do Sono Induzido por Éter Etílico	39
3.6.3	Teste das Convulsões Induzidas por Pentilenotetrazol	40
3.6.4	Testes da Transição Claro-Escuro e do	42

	Campo Aberto	
3.6.5	Teste da Suspensão Pela Cauda	44
4	RESULTADOS	49
4.1	Padronização do teste da HIE	51
4.2	Efeito dos extratos de diferentes partes de <i>P. edulis</i> no teste da HIE	53
4.3	Efeitos neurofarmacológicos do EA do pericarpo de <i>P. edulis</i>	61
4.3.1	Teste do sono induzido por éter etílico	61
4.3.2	Teste das convulsões induzidas por PTZ	63
4.3.3	Teste da transição claro-escuro e do campo aberto	65
4.3.4	Teste da suspensão pela cauda	68
4.4	Efeitos neurofarmacológicos das frações FB e FAR obtidas a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i>	70
4.4.1	Teste da transição claro-escuro e do campo aberto	70
4.4.2	Teste da suspensão pela cauda	73
4.5	Efeitos neurofarmacológicos da isoorientina e da FF obtidas a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i>	75
4.5.1	Teste da transição claro-escuro e do campo aberto	75
4.5.2	Teste da suspensão pela cauda	78
4.6	Investigação dos possíveis mecanismos de ação neurofarmacológica da isoorientina obtida a partir do pericarpo de <i>P. edulis</i>	80
4.6.1	Envolvimento do sistema GABA-benzodiazepínico no efeito tipo-ansiolítico da isoorientina no teste da transição claro-escuro e do campo aberto	80
4.6.2	Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-ansiolítico da isoorientina no teste da transição claro-escuro e do campo aberto	82
4.6.3	Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo da isoorientina no teste da suspensão pela cauda	84
4.6.4	Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo da isoorientina no	86

	teste da suspensão pela cauda	
5	DISCUSSÃO	89
6	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
	ANEXOS	145

*Há muito tempo que eu saí de casa
Há muito tempo que eu caí na estrada
Há muito tempo que eu estou na vida
Foi assim que eu quis, e assim eu sou feliz
Principalmente por poder voltar
A todos os lugares onde já cheguei
Pois lá deixei um prato de comida
Um abraço amigo, um canto prá dormir e sonhar
E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar
É tão bonito quando a gente pisa firme
Nessas linhas que estão nas palmas de nossas mãos
É tão bonito quando a gente vai à vida
Nos caminhos onde bate, bem mais forte o coração*

Caminhos do Coração
(Gonzaguinha)

RESUMO

As espécies vegetais pertencentes ao gênero *Passiflora* são chamadas popularmente de maracujá e são utilizadas tradicionalmente na medicina popular como sedativo, ansiolítico natural, e no tratamento e prevenção da irritabilidade, insônia e nervosismo. Embora a Farmacopeia Brasileira considere como a espécie oficial do gênero *Passiflora* apenas a espécie *Passiflora alata*, a espécie *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener, popularmente conhecida no Brasil como “maracujá azedo” ou “maracujá amarelo”, é a mais frequentemente usada tanto para a produção de suco pela indústria alimentícia quanto como remédio pela população. Esta tese investigou os efeitos neurofarmacológicos do extrato aquoso (EA), fração butanólica (FB) e fração aquosa residual (FAR) obtidos a partir do pericarpo dos frutos da espécie *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* (*P. edulis*). No teste da transição claro-escuro, o tratamento por via oral com o EA do pericarpo aumentou o tempo de permanência no compartimento claro do modelo, de maneira semelhante ao efeito do diazepam, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico. Além disso, reduziu significativamente o tempo para início do sono induzido por éter etílico, além de aumentar a duração total do sono. No teste da suspensão pela cauda, o tratamento com o EA produziu efeito tipo-antidepressivo, representado pelo aumento da latência para a primeira imobilidade e redução do tempo total de imobilidade, de maneira semelhante ao efeito da imipramina. A FB produziu efeitos semelhantes, tanto no teste da transição claro-escuro, quanto no da suspensão pela cauda, enquanto a FAR mostrou-se desprovida de ação neurofarmacológica. A presença de flavonoides C-glicosídeos, identificados como vicenina-2, 6,8-di-C-glicosilcrisina, spinosina e isoorientina, o último como composto majoritário, tanto no EA quanto na FB, foi associada aos efeitos neurofarmacológicos observados. O tratamento por via oral com a isoorientina isolada promoveu tanto um efeito tipo-ansiolítico no teste da transição claro-escuro, quanto um efeito tipo-antidepressivo no teste da suspensão pela cauda. No teste da transição claro-escuro, o pré-tratamento com flumazenil, antagonista benzodiazepínico, não bloqueou o efeito tipo-ansiolítico da isoorientina, enquanto o pré-tratamento com WAY-100635, antagonista 5-HT_{1A}, bloqueou tal efeito. No teste da suspensão pela cauda, o pré-tratamento com *p*-clorofenilalanina, inibidor da síntese de serotonina, bloqueou o efeito tipo-antidepressivo da isoorientina, enquanto não houve bloqueio após o pré-tratamento com prazosina,

antagonista adrenérgico. Esses resultados sugerem que a atividade neurofarmacológica do pericarpo de *P. edulis*, observada pela primeira vez neste trabalho, está relacionada à presença de flavonoides C-glicosídeos, principalmente a isoorientina, a qual parece promover atividade tipo-ansiolítica e antidepressiva via mecanismos serotoninérgicos de neurotransmissão. O presente trabalho descreve, portanto, a atividade neurofarmacológica de uma parte da planta – a casca – que é considerada resíduo industrial e, portanto, descartada. Cerca de 300 mil toneladas de cascas dos frutos de *P. edulis* são descartadas anualmente, o que representa um desperdício de material que poderia ser utilizado como matéria-prima para diferentes tipos de indústria, inclusive, ou principalmente, a farmacêutica.

ABSTRACT

The species of *Passiflora* genus are used in traditional medicine as sedative, anxiolytic and in the treatment and prevention of irritability, insomnia and nervousness. *Passiflora edulis* variety *flavicarpa* Degener, popularly known in Brazil as “maracujá azedo” or “maracujá amarelo” is frequently used in juice production by the food industry and as remedy by population. This work investigated the neuropharmacological effects of the aqueous extract (AE), butanolic fraction (BF) and aqueous residual fraction (ARF) obtained from the pericarp of the fruits of *Passiflora edulis* variety *flavicarpa* (*P. edulis*), popularly known in Brazil as “maracujá”. In the light-dark transition test, oral treatment with AE enhanced the time in the light compartment, similarly to the effects of diazepam, suggesting an anxiolytic-like effect. Moreover, AE decreased the latency and enhanced the total time of the sleep induced by ethyl ether. In the tail suspension test, treatment with AE produced antidepressant-like effects, enhancing the latency to the first immobility episode and reducing of the total time of immobility, similarly to imipramine. BF induced similar effects in both tests, while the ARF did not show any neuropharmacological effect. The presence of C-glycosylflavonoids identified as vicianin-2, 6-8-di-C-glycosylchrisin, spinosin and isoorientin, major compound, in the AE and BF, was related to the neuropharmacological effects observed. Oral treatment with the isolated isoorientin promoted an anxiolytic-like effect at the light-dark transition test and a antidepressant-like effect at the tail suspension test. In the light-dark transition test, pre-treatment with flumazenil, a benzodiazepine antagonist, did not block the anxiolytic-like of isoorientin, while pre-treatment with WAY-100635, a 5-HT_{1A} antagonist, blocked this effect. In the tail suspension test, pre-treatment with p-chlorophenylalanine, an inhibitor of serotonin synthesis, blocked the antidepressant-like effect of isoorientin, while prazosin, an adrenergic antagonist, did not. These results suggest that the neuropharmacological activity of the pericarp of *P. edulis*, observed for the first time in the present work, is related to the presence of C-glycosylflavonoids, mainly isoorientin, that seems to promote the anxiolytic and antidepressant-like activity by serotonergic mechanisms. Therefore, the present study describes the neuropharmacological activity of a plant part – the pericarp – that is considered industrial residue. Considering that Brazilian production of the fruits of this plant species is about 450 thousand ton/year and that the pericarp represents about 70%

of this amount, this material could be used as raw material by different industries, including, or especially, the pharmaceutical on



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais neurofarmacologicamente ativas

O uso de produtos naturais como agentes psicoativos para aliviar transtornos relacionados ao sistema nervoso central ou para criar estados alterados de consciência data provavelmente de tempos muito remotos, quando os primeiros experimentos de tentativa e erro feitos por xamãs ou outros experimentadores levaram à descoberta dos efeitos que certos vegetais exercem sobre a mente humana (CLEMENT et al., 2004; ZHANG, 2004; PRISINZANO, 2009). As plantas psicoativas exercem profundos efeitos sobre a consciência humana, emoção e cognição, e têm sido utilizadas pelo ser humano ao longo dos tempos com finalidades recreativas, espirituais e terapêuticas. Muitas dessas espécies vegetais, a despeito de terem seu uso registrado há séculos, são ainda amplamente utilizadas nos dias de hoje, como é o caso de *Coffea arabica* (café), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Cannabis sativa* (maconha), *Papaver somniferum* (ópio), entre outras espécies (O'CONNOR E ROTH, 2005). É significativo, portanto, o fato de que o primeiro alcaloide a ser purificado – a morfina – tenha sido descoberto justamente em uma espécie vegetal psicoativa (CLEMENT et al., 2004). Diferentes áreas da ciência ocupam-se em estudar as relações criadas entre tais espécies e as diferentes sociedades humanas. Em diferentes regiões do mundo há relatos de um grande número de espécies vegetais com suposta atividade psicoativa. Essas espécies fornecem um vasto repertório de substâncias potencialmente úteis, as quais podem dar origem a modernos compostos farmacêuticos para uso psiquiátrico. Além disso, o conhecimento básico sobre os transtornos mentais como sendo decorrentes de uma alteração neuroquímica, bem como nossa habilidade em tratar esses transtornos, tem aumentado consideravelmente com o auxílio do estudo sobre os efeitos das plantas neurofarmacologicamente ativas sobre a neurobiologia humana, e a contínua avaliação do sítio molecular de ação de drogas psicoativas vegetais pode ajudar a expandir a lista atualmente existente de alvos válidos para a descoberta de novas drogas de ação central (O'CONNOR E ROTH, 2005).

Ao longo da história, a investigação sobre drogas que afetam o sistema nervoso têm se centrado principalmente sobre aquelas que tratam ou combatem os sintomas dos transtornos psiquiátricos. Mais recentemente, também tem sido dado muito destaque àquelas que

tenham alguma ação sobre doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer ou alguns tipos de epilepsias, ou que ajam como potentes analgésicos, entre outras categorias terapêuticas (GURIB-FAKIM, 2006). A reserpina é um exemplo clássico: isolada de *Rauwolfia serpentina*, esse fármaco, inicialmente usado para o tratamento da hipertensão, revolucionou o tratamento da esquizofrenia e permitiu que os doentes evitassem a hospitalização, único recurso antes da introdução de drogas como a clorpromazina e o haloperidol. Quando se trata de outras condições psiquiátricas, os medicamentos à base de espécies vegetais podem representar uma possibilidade de tratamento, principalmente quando são considerados os dados estatísticos que apontam para o fato de que a depressão e a ansiedade afetam uma em cada seis pessoas e que 40% das pessoas que têm outros tipos de transtornos psiquiátricos também desenvolvem sintomas de ansiedade e depressão. Muitos desses pacientes acabam desenvolvendo também distúrbios do sono e é principalmente na tentativa de manejar esses distúrbios que os medicamentos fitoterápicos são bastante empregados (GURIB-FAKIM, 2006).

A maioria dos medicamentos fitoterápicos indicados para o tratamento de distúrbios psiquiátricos são extratos brutos ou semipurificados, como os de *Hypericum perforatum* (erva-de-São-João), *Ginkgo biloba* (gingko), *Panax ginseng* (ginseng), *Melissa officinalis* (melissa), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Crataegus oxyacantha* (pilriteiro ou cratego), *Piper methysticum* (kava-kava) e diferentes espécies de *Passiflora* (maracujá), os quais reacenderam o interesse da indústria farmacêutica por produtos de origem vegetal (MONTANARI E BOLZANI, 2001).

Embora exista uma extensa literatura sobre o uso de plantas e de extratos de plantas como agentes psicoativos (Zhang, 2004), a busca por produtos naturais com finalidades psicoativas terapêuticas tem sido menos desenvolvida do que, por exemplo, a busca por agentes anticancerígenos (CLEMENT et al., 2004). No entanto, existem exemplos suficientes de pesquisa bem sucedida por agentes psicoativos vegetais os quais reforçam o fato de que a continuidade de tais pesquisas pode ser bastante produtiva. Diferentes plantas utilizadas em função de suas propriedades psicoativas já deram origem a um grande número de substâncias isoladas, como a efedrina, os canabinoides, os opioides e a reserpina, apenas para citar alguns exemplos. Algumas apresentam propriedades alucinógenas, outras propriedades estimulantes, hipnotizantes, antidepressivas, ansiolíticas, antipsicóticas, neuroprotetoras,

entre outras propriedades centrais. No entanto, para muitas das plantas com ação central, os princípios ativos ainda são desconhecidos (CARLINI, 2003; CLEMENT et al., 2004, ZHANG, 2004). Após o isolamento de tais substâncias, a tendência seguida por diferentes grupos de pesquisa ao redor do mundo parece ser a de desenvolver estudos visando a elucidação de seus possíveis mecanismos de ação. Desta forma, hoje existe uma ampla gama de informações a respeito da influência de determinadas substâncias isoladas de plantas sobre diferentes vias de neurotransmissão (CLEMENT et al., 2004). Clement e colaboradores (2004) apresentam uma vasta revisão sobre substâncias neurofarmacologicamente ativas que já foram isoladas a partir de espécies vegetais. A Tabela 1, modificada deste trabalho, sumariza essas informações.

Tabela 1 – Substâncias psicoativas isoladas a partir de espécies vegetais e seus mecanismos respectivos de ação atualmente conhecidos.

Composto	Espécie vegetal	Tipo de ação central promovida	Mecanismo primário de ação e outros mecanismos
β -carbolinas (harmana, harmalina, etc)	<i>Banisteriopsis caapi</i>	alucinógena	agonista parcial 5-HT ₂ ; inibidores da enzima MAO
ibogaina	<i>Tabernanthe iboga</i>	alucinógeno	em investigação; possível bloqueador da liberação de dopamina induzida por nicotina
mescalina	<i>Lophophora williamsi</i> *	alucinógeno	mecanismo monoaminérgico; agonista 5-HT ₂
salvinorina A	<i>Salvia divinorum</i>	alucinógeno	agonista de receptor κ -opióide
cafeína	<i>Coffea arabica</i>	estimulante	antagonista adenosinérgico
cathinona	<i>Catha edulis</i>	estimulante	liberador de dopamina
cocaína	<i>Erythroxylon coca</i>	estimulante	bloqueador da recaptação de monoaminas
efedrina	<i>Ephedra sinica</i>	estimulante	agonista de α e β -adrenoreceptor
nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	estimulante	agonista colinérgico
morfina, codeína	<i>Papaver somniferum</i>	analgésico	agonista opióide
apigenina	<i>Matricaria chamomilla</i>	hipno-sedativo	reduzidor da corrente de Cl ⁻ ativada por GABA
galfimina B	<i>Galphimia glauca</i>	hipno-sedativo	dopaminérgico
hiperforina	<i>Hypericum perforatum</i>	antidepressivo	inibição da enzima COMT
kavaína	<i>Piper methysticum</i>	ansiolítico	inibidor de canais de cálcio; agonista BZD
orientina	<i>Jatropha ciliata</i>	ansiolítico	mecanismo desconhecido (efeito anti-conflito em animais de laboratório)
galantamina	<i>Narcissus sp</i>	potencial agente anti-Alzheimer	inibidor competitivo de acetilcolinesterase
crisina	<i>Passiflora coerulea</i>	anticonvulsivante	agonista BZD
polygalasaponinas	<i>Polygala tennifolia</i>	potencial antipsicótico	antagonista dopaminérgico e serotoninérgico
linalool	diferentes espécies vegetais	anticonvulsivante	inibidor da liberação de glutamato

poligodial	<i>Drymis winteri</i>	relaxante muscular	antagonista noradrenérgico
------------	-----------------------	--------------------	----------------------------

*embora não se trate de uma espécie vegetal e, sim, de uma espécie de fungo, está incluída na tabela apenas para ilustrar alguns compostos psicoativos isolados a partir de produtos naturais (modificada de CLEMENT et al., 2004).

Embora a eficácia clínica de muitos fitomedicamentos venha sendo revelada por testes clínicos conduzidos durante as últimas três décadas, os esforços concentrados no desenvolvimento de psicoterápicos estrutural e funcionalmente novos, a partir de remédios vegetais tradicionalmente utilizados, ainda são raros (KUMAR, 2006). O fato de que a grande maioria das drogas psicoativas atualmente disponíveis não são derivadas de constituintes bioativos de plantas medicinais parece refletir esta situação. No entanto, essa não é a situação de muitas outras áreas terapêuticas, onde exemplos de drogas derivadas de metabólitos secundários de plantas e seus derivados, ou concebidas a partir do conhecimento tradicional, são abundantes (KUMAR, 2006). Uma análise sistemática, publicada em 1997 por CRAGG e colaboradores, relata que 157 das 520 drogas aprovadas pelo FDA entre 1983 e 1994 foram obtidas de produtos naturais, ou eram derivadas dos mesmos. Essa análise também revelou que, quando são realizados esforços para a descoberta de novas drogas, o sucesso da pesquisa aumenta dramaticamente quando focados em produtos naturais para uso clínico. Como exemplo disto, os autores afirmam que, durante o mesmo período, 61% dos agentes anticancerígenos aprovados eram produtos naturais ou derivados. No entanto, ressaltam que nenhum analgésico, antidepressivo, ansiolítico, ou qualquer outra droga neurofarmacologicamente ativa derivada de produtos naturais foi aprovada durante o período de 11 anos analisado no referido trabalho (CRAGG et al., 1997). Novamente, embora a identificação de novos compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário vegetal continue a ser o principal objetivo de muitos projetos de descoberta de novas drogas, tais esforços não parecem se concentrar na busca por agentes potencialmente úteis no tratamento de transtornos do sistema nervoso central (KUMAR, 2006). Em geral, o principal objetivo desses trabalhos parece ser gerar mais evidências científicas que justifiquem seus usos terapêuticos tradicionais.

1.2. Plantas “calmantes”, “tranquilizantes” ou ansiolíticas: o gênero *Passiflora* e a espécie *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener

Atualmente, reconhece-se que o uso centenário de algumas plantas como recurso terapêutico pode ser levado em consideração como prova de sua eficácia (RATES, 2001). Muitas espécies vegetais utilizadas em função de suas propriedades “calmantes”, “tranquilizantes” e ansiolíticas possuem uma tradição centenária de uso. Algumas delas, já mencionadas anteriormente, merecem destaque tanto em função do uso tradicional, quanto em função do número de trabalhos disponíveis na literatura: *Valeriana officinalis*, *Piper methysticum*, *Hypericum perforatum* e *Passiflora* sp. Este último gênero é o objeto de estudo do presente trabalho.

As espécies vegetais pertencentes ao gênero *Passiflora* são chamadas popularmente de maracujá e têm sido utilizadas tradicionalmente na medicina popular de vários países como sedativo, ansiolítico natural, e no tratamento e prevenção da irritabilidade, insônia e nervosismo (RENDLE, 1959; PIO CORREA, 1978; OGA et al., 1984; HICKEY E KING, 1988). O gênero é considerado o maior da família Passifloraceae em termos de número de espécies descritas e compreende cerca de 400 a 500 espécies vegetais, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (RENDLE, 1959; HICKEY E KING, 1988). Desse grande número de espécies, aproximadamente 150 são espécies nativas brasileiras (SPENCER E SEIGLER, 1983) e, dentre essas, cerca de 60 produzem frutos que podem ser consumidos como alimento pela população ou usados industrialmente na produção de sucos (CÓRDOVA et al., 2005).

Embora a Farmacopeia Brasileira considere como a espécie oficial do gênero *Passiflora* apenas a espécie *Passiflora alata* (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1977), a espécie *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener (objeto do presente estudo e que será denominada apenas de *P. edulis* neste trabalho), popularmente conhecida no Brasil como “maracujá azedo” ou “maracujá amarelo”, é a mais frequentemente usada tanto para a produção de suco pela indústria alimentícia quanto como remédio pela população (PIO CORREA, 1978; SACCO, 1980; SATO et al., 1992; CÓRDOVA et al., 2005).

O maracujá da espécie *P. edulis* (Figura 1), embora originário do território brasileiro, é amplamente cultivado em todo o mundo, sendo o Brasil considerado seu primeiro produtor mundial (SATO et al., 1992; REIS et al., 2000). Embora vinte e seis estados brasileiros estejam

envolvidos no cultivo do maracujá, dez desses respondem por mais de 40% do volume da produção, entre os quais estão os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Pernambuco e Alagoas (OLIVEIRA et al., 2002; CORDOVA et al., 2005). No Brasil, a ampla utilização e cultivo da espécie se devem basicamente a dois fatores: ao seu consumo no preparo de sucos e outros produtos alimentícios, tais como sorvetes, bebidas alcoólicas, entre outros, e ao uso popular tradicional, tanto do suco quanto do chá preparado a partir das folhas, como remédio no tratamento de condições nervosas, insônia, irritabilidade, inquietação, entre outros sintomas relacionados à agitação psicomotora (PIO CORREA, 1978; OGA et al., 1984; DOYAMA et al., 2005; CORDOVA et al., 2005; SOUZA et al., 2007).



Figura 1 – Flor e frutos do maracujá da espécie *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener. Fotos gentilmente cedidas pela Dra. Silvana Zucolotto Langassner.

Do ponto de vista econômico para o Brasil, a importância do cultivo da espécie vem aumentando de forma marcante. A sua dispersão agrícola, intensificada na década de 70, promoveu o surgimento de campos de cultivo em diversas regiões brasileiras (MARTINS et al., 2005). Até a década de 70, a produção de maracujá era apenas incipiente e, a partir dos anos 80, passou a apresentar um grande crescimento em área cultivada. Além disso, a popularização do consumo de frutas *in natura* nos grandes centros consumidores, aliada ao crescimento das indústrias extratoras de sucos, fez com que o maracujá ganhasse grande expressão econômica nacional (MELETTI E MAIA, 1999; DE MARCHI et al., 2000). A década de 90 foi caracterizada pela valorização do preço da fruta fresca e pela modificação dos hábitos de

consumo. Trata-se de uma das poucas frutas nacionais que apresentou aumento no consumo domiciliar na última década. De acordo com dados do IBGE de 1999, o consumo *per capita* de maracujá passou de 0,28 kg em 1987 para 0,96 kg em 1996, o que representa um aumento de 238% em nove anos (CÓRDOVA et al., 2005). A própria produção dos frutos deu um grande salto em relativamente poucos anos: de acordo com dados fornecidos por uma indústria nacional de sucos, a produção brasileira dos frutos em 1993 foi da ordem de 150 mil toneladas (REIS et al., 2000); em 1998, essa produção ultrapassou as 290 mil toneladas (CHABARIBERY E ALVES, 2001); finalmente, em 2003, o Anuário Estatístico do Brasil apontou uma produção anual de mais de 480 mil toneladas dos frutos (CÓRDOVA ET AL., 2005). Considerando que 95% de toda a produção brasileira de maracujá refere-se à espécie *P. edulis* (MELETTI E BRÜCHNER, 2001), tem-se uma produção estimada, portanto, de cerca de 450 mil toneladas de frutos dessa espécie.

Neste ponto, é importante ressaltar que entre 65 e 70% do peso do maracujá produzido no Brasil consiste em cascas e sementes (REIS et al., 2000). Considerando a produção total dos frutos estimada no ano de 2003, que foi de 480 mil toneladas, teriam sido produzidas, portanto, entre 310 e 340 mil toneladas de cascas e sementes. OLIVEIRA e colaboradores (2006) afirmam que 90% dessas cascas são descartadas, sendo o restante aproveitado na preparação de ração animal. Os mesmos autores enfatizam, ainda, a necessidade de se estudar uma forma de aproveitamento racional e eficiente do “resíduo” representado pelas cascas dos frutos cultivados. Atualmente, a casca do maracujá, que normalmente seria descartada ou aproveitada apenas no preparo de silagem ou ração animal, é utilizada, ainda em pequena escala, na forma de uma farinha recomendada como auxiliar em regimes de emagrecimento. Isso se deve, segundo os autores, tanto à alta concentração de fibras (NEUMANN, 2005), quanto à presença de pectina (RAMOS et al., 2007).

Do ponto de vista etnofarmacológico, as espécies do gênero *Passiflora* são frequentemente utilizadas pela população como “calmante”, indutor do sono, sedativo e ansiolítico (PIO CORREA, 1978; SACCO, 1980; OGA et al., 1984; HICKEY E KING, 1988; MOWREY, 1992; LORENZI E MATOS, 2002). Além de suas ações neurofarmacológicas, o chá das folhas também é usado tradicionalmente como analgésico, anti-espasmódico, anti-asmático, para o tratamento de

febres intermitentes e de doenças inflamatórias (PIO CORREA, 1978; SACCO, 1980; SEAFORTH et al., 1983).

Existe um grande número de estudos disponíveis na literatura acerca das propriedades neurofarmacológicas de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*, como *P. alata* (OGA et al., 1984; PETRY et al., 2001; REGINATTO et al., 2006; BARBOSA et al., 2008), *P. actinia* (SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 2006; LOLLI et al., 2007), *P. quadrangularis* (CASTRO et al., 2007) e *P. incarnata* (SPERONI E MINGUETTI, 1988; SPERONI et al., 1996; SOULIMANI et al., 1997; NASSIRI-ASL et al., 2007). Analisando os trabalhos atualmente disponíveis na literatura sobre as possíveis atividades neurofarmacológicas de diferentes espécies do gênero *Passiflora*, foi possível compilar tais informações e organizar uma tabela como a apresentada a seguir (Tabela 2). Na Tabela 2 são apresentadas informações relevantes destes trabalhos, tais como a espécie investigada, a parte da planta utilizada, o tipo de extrato, o tipo de avaliação – clínica ou experimental e, no caso de ser experimental, a espécie de animal usada, bem como as doses envolvidas –, a via de administração, os testes neurofarmacológicos realizados e, finalmente, os resultados obtidos. Os critérios para a seleção de tais trabalhos foram: ser investigação experimental ou clínica dos possíveis efeitos neurofarmacológicos de espécies de *Passiflora*; ter acesso ao trabalho na íntegra; ser mencionado em alguma base de dados, e ser trabalho original e não de revisão. Os trabalhos estão organizados em ordem crescente de data de publicação e, dentro de um mesmo ano, por ordem alfabética do nome do primeiro autor.

Tabela 2 – Trabalhos atualmente disponíveis na literatura científica sobre possíveis atividades neurofarmacológicas de espécies vegetais pertencentes ao gênero *Passiflora*.

AUTORES	ANO	ESPÉCIE	PARTE DA PLANTA	TIPO DE EXTRATO	TIPO DE AVALIAÇÃO, ANIMAIS, DOSES	VIA ADM.	TESTES REALIZADOS	RESULTADOS OBSERVADOS
Valle e Leite	1983	<i>P. edulis</i>	folhas	aquoso	experimental; camundongos; 20 e 40 mg/kg (5 minutos antes do teste)	ip	- caixa de movimentação espontânea - teste da catalepsia - sono por pentobarbital - convulsão por cardiazol e por eletrochoque máximo convulsivo (EMC)	- ↓ movimentação espontânea a partir de 15 minutos - ↑ tempo de catatonía - ↑ tempo de sono na dose de 20 mg/kg - ausência de atividade anticonvulsivante
Oga et al.	1984	<i>P. alata</i>	folhas	aquoso	experimental; fitoquímica; camundongos; doses de 75 e 140 mg/kg	ip	- toxicidade aguda e DL50 - tempo de sono induzido por pentobarbita (PBS) - convulsões por pentilenotetrazol (PTZ) - analgesia - atividade locomotora espontânea	- presença de alcaloides do tipo harmana - vitexina, isovitexina e isorientina na fração rica em flavonoides - efeito letal em doses superiores a 432 mg/kg (morte em 24 h) - DL50: 456 mg/kg - ↑ tempo de sono e ↓ latência - atividade anticonvulsivante (↑ latência e ↑ tempo de vida) - sem efeito analgésico - 150 mg/kg reduziu atividade motora, antagonizada por anfetamina

Speroni e Minguetti	1988	<i>P. incarnata</i>	folhas e talos (juntos)	etanólico, fração éter de petróleo, fração butanólica, fração aquosa	experimental; ratos e camundongos; dose extrato bruto: 160 mg/kg dose fração I: 4 mg/kg dose fração II: 30 mg/kg dose fração 3: 224 mg/kg	ip	- teste <i>tail flick</i> - teste da placa quente - vocalização - limiar convulsivo PTZ - sono barbitúrico - locomoção em caixa de atividade - toxicidade aguda	- ↑ latência para convulsão e sobrevivência - ↑ latência para reação à dor - ↑ tempo de sono (só a fração III que não) - ↓ locomoção caixa atividade - toxicidade aguda > 900 mg/kg
Maluf et al.	1991	<i>P. edulis</i>	folhas	aquoso e chás	experimental; clínica; camundongos e ratos	ip oral	- sono barbitúrico - teste da barra giratória - eletrocorticograma - convulsão induzida por PTZ - toxicologia - efeito hipnótico humano agudo - toxicologia humana	- chá i.p. ↑ tempo de sono - não houve alteração no rota-rod - não houve alterações EEG - não houve efeito nas convulsões por PTZ - ↑ enzimas séricas após tratamento 60 dias - alterou algumas medidas séricas em voluntários - sem efeitos hipnóticos em voluntários - sem alteração ECG voluntários
Speroni et al.	1996	<i>P. incarnata</i>	partes aéreas	etanólico; extrato seco; multifração	experimental; camundongos; 65, 125 e 250 mg/kg	ip e oral	- atividade locomotora espontânea (caixa de atividade) - sono barbitúrico - limiar convulsivo e morte por PTZ	- etanólico ↓ atividade na dose de 125 i.p. e na dose de 250 v.o. - multifração: ↓ atividade na dose de 60 mg/kg - multifração: ↑ tempo de sono dose de 60 mg/kg - multifração: ↑ latência início convulsões
Soulimani et al.	1997	<i>P. incarnata</i>	partes aéreas	hidroetanólico; aquoso; mistura de	experimental; camundongos; doses variáveis de	ip	- teste da escada (hidroetanólico e aquoso doses:	- aquoso: sedativo nas doses 400 mg/kg e 800 mg/kg (↓ atividade no <i>staircase</i> e na exploração livre)

				compostos purificados	acordo com o teste empregado		3,6,25,100,400 e 800 mg/kg; alcaloides+maltol e flavonoides+maltol) - claro-escuro (hidroetanólico doses: 100,200,400 e 800 mg/kg) - exploração livre (aquoso doses: 25,100,400 e 800 e hidroetanólico dose de 800) - sono por pentobarbital (aquoso e hidroetanólico doses de 400 e 800)	- aquoso: ↑ sono na dose 800 - flumazenil não modificou a atividade do extrato no teste da escada - hidroetanólico: sem efeitos sedativos; ↑ tempo e levantamentos no claro e atividade na dose 400 mg/kg - as misturas de alcaloides e flavonoides com maltol não exibiram nenhum efeito no teste da escada
Akhondzadeh et al.	2001a	<i>P. incarnata</i>	não indicado	não indicado	clínica; doses não indicadas	oral	abstinência a opiáceos	- redução sintomas físicos e mentais da abstinência
Akhondzadeh et al.	2001b	<i>P. incarnata</i>	não indicado	não indicado	clínica; doses indicadas	oral	transtorno de ansiedade generalizada (TAG)	- eficácia comparada ao oxazepam no TAG - ausência de prejuízos ao desempenho profissional
Coleta et al.	2001	<i>P. edulis</i>	folhas	aquoso (infusão das folhas)	experimental; camundongos; doses de 5 a 100 mg/kg	ip	- labirinto em cruz elevado - teste do campo aberto - teste do arame	- a infusão das folhas de <i>P. edulis</i> não apresentou nenhum efeito

Dhawan et al.	2001a	<i>P. incarnata</i> <i>P. edulis</i>	partes aéreas	éter de petróleo, clorofórmio, metanólico, aquoso	experimental; camundongos ambos os sexos 75,100,125,200,300 mg/kg	oral	- labirinto em cruz elevado	- efeitos de <i>P. edulis</i> e <i>P. incarnata</i> são diferentes - <i>P. incarnata</i> metanólico apresentou efeitos equivalentes aos produzidos por diazepam - <i>P. incarnata</i> é a espécie medicinalmente interessante
Dhawan et al.	2001b	<i>P. incarnata</i>	folhas e pecíolos, talos e gavinhas, flores incluindo botões, raízes	éter de petróleo, clorofórmio, metanólico, aquoso	experimental camundongos 75,100,125,200,300 mg/kg	oral	- labirinto em cruz elevado	- as raízes de <i>P. incarnata</i> , por serem desprovidas de efeitos, agem como adulterantes - presença de flores e talos também é indesejável - somente folhas apresentam resultados tipo-ansiolíticos
Dhawan et al.	2001c	<i>P. incarnata</i>	partes aéreas	éter de petróleo, clorofórmio, metanólico, aquoso	experimental camundongos 75,100,125,200,300 mg/kg	oral	- labirinto em cruz elevado	- extrato metanólico ↑ atividade ansiolítica dose de 100 mg/kg
Petry et al.	2001	<i>P. alata</i> <i>P. edulis</i>	folhas	hidroetanólicos	experimental; fitoquímica; ratos; 25, 50, 100 e 150 mg/kg	ip	- cromatografia - labirinto em cruz elevado	- espectro UV de <i>P. edulis</i> e <i>P. alata</i> similares - <i>P. edulis</i> : quase 2 x mais flavonóides que <i>P. alata</i> - <i>P. edulis</i> : vitexina, isovitexina, orientina e isorientina. <i>P. alata</i> não - triterpenoides somente em <i>P. alata</i> - sem crisina - <i>P. alata</i> (100 e 150 mg/kg) e <i>P.</i> <i>edulis</i> (50, 100 e 150 mg/kg) ↑ tempo nos braços abertos
Bruschi et al.	2002	<i>P. edulis</i>	folhas	hidroetanólico	experimental; camundongos; 10, 20, 40, 80 mg/kg	ip oral	- teste do campo aberto - sono induzido por pentobarbital	- ↓ locomoção - ↑ o tempo de sono apenas no tratamento ip - produziu catatonia

							- teste da catatonía	- efeito depressor central
De-Paris et al.	2002	<i>P. alata</i> <i>P. edulis</i>	folhas	aquoso	experimental; ratos; 25, 50, 100 e 150 mg/kg	ip	- CLAE - labirinto em cruz elevado	- ↑ tempo braços abertos (maiores doses) - ↑ no. entradas braços abertos (maiores doses) - atividade tipo-ansiolítica - EA das folhas de <i>P. edulis</i> com o dobro de flavonoides de <i>P. alata</i>
Dhawan et al.	2002a	<i>P. incarnata</i>	partes aéreas	fração benzoflavona	experimental; camundongos; 10, 20 e 50 mg/kg	oral	- tratamento crônico com etanol e labirinto	- preveniu a dependência ao álcool e diminuiu a ansiedade após a abstinência - diminuição do desenvolvimento e da expressão da dependência - animais tratados não manifestaram comportamento de desejo do álcool
Dhawan et al.	2002b	<i>P. incarnata</i>	partes aéreas	fração benzoflavona	experimental; camundongos; 10 e 20 mg/kg	oral	- tratamento durante 6 dias com Δ9-THC	- animais que receberam a fração desenvolveram menos tolerância e dependência - diminuição dos sintomas de abstinência
Dhawan et al.	2003	<i>P. incarnata</i>	partes aéreas	fração benzoflavona	experimental; camundongos; 10, 50 e 100 mg/kg	oral	- tratamento com DZP durante 21 dias e atividade locomotora	- tratamento repetido com fração (21 dias) não produziu dependência - bloquearam os efeitos de abstinência ao DZP
Anseau	2004	<i>P. incarnata</i>	não indicado	extrato seco (cápsulas de Sedaxio® - 200 mg)	clínica	oral	ansiedade generalizada e insônia	- efeito ansiolítico com ausência de miorelaxamento
Akhondzadeh et al.	2005	<i>P. incarnata</i>	não indicado	não indicado	clínica	oral	- transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH)	- eficácia comparada ao metilfenidato no TDAH - melhora já na segunda semana - ausência de diminuição de apetite e ansiedade - sem diferenças entre os dois grupos nos efeitos colaterais

Capasso e Sorrentino	2005	<i>P. incarnata</i> (combinado a Kava ou sozinha)	toda a planta	extrato etanólico comercial	experimental; camundongos; 250 mg/kg	oral	- hipermobilidade induzida por anfetamina - sono induzido por pentobarbital	- diminuição da hiperatividade induzida pela anfetamina - kava + passiflora diminuiu ainda mais - tempo de sono aumentado em 53%
Santos et al.	2005	<i>P. actinia</i>	folhas	hidroetanólico; metanólico; fração aquosa frações cromatogr. A e C	experimental; camundongos; hidroetanólico: 30,100 e 300 mg/kg metanólico: 100 e 300 mg/kg fração aquosa: 100 e 300 mg/kg frações A e C: 100 e 300 mg/kg	ip	- catalepsia induzida por haloperidol	- todos os extratos e frações testados produziram catalepsia na dose de 300 mg/kg, exceto fração aquosa, que produziu na dose de 100 mg/kg - efeitos atribuídos à presença de saponinas e não flavonoides
Shinomiya et al.	2005	<i>P. incarnata</i>	partes aéreas	extrato aquoso (comercial)	experimental; ratos; 300, 1000 e 3000 mg/kg	oral	- modelo sono interrompido - registro de EEG e EMG	- extrato de <i>P. incarnata</i> não apresentou efeito nem na latência para o início do sono nem nos padrões de EEG e EMG
Coleta et al.	2006	<i>P. edulis</i>	folhas	extrato aquoso; fração rica em flavonoides	experimental; camundongos; infusão aquosa: doses entre 14,4 e 230 mg/kg fração rica em flavonoides: doses entre 1 e 100 mg/kg	oral	- labirinto em cruz elevado - análise por CLAE - teste de esconder as esferas - teste do arame para avaliação motora	- resultados significativos após 60 minutos e não significativos após 90 ou 120 min - dose de 230 mg/kg ↑ o tempo e o número de entradas nos braços abertos; ↓ o tempo gasto em esconder as esferas; sem alterações motoras - a fração rica em flavonoides aumentou o tempo e o número de entradas nos braços abertos na dose de 100 mg/kg e reduziu o tempo gasto em esconder esferas, mas com ligeiro déficit motor
Reginatto et al.	2006	<i>P. edulis</i> <i>P. alata</i>	folhas	aquoso <i>spray-dried</i>	experimental; fitoquímico;	oral	- labirinto em cruz elevado	- <i>P. alata</i> (800 mg/kg) e <i>P. edulis</i> (400 e 800 mg/kg) ↑ entradas e

					ratos; 200, 400 e 800 mg/kg		- cromatografias	tempo nos braços abertos - ausência de crisina em ambos os extratos - extratos com perfis diferentes de flavonoides - presença da saponina quadrangulosídeo no extrato de <i>P. alata</i> - vitexina e orientina em <i>P. edulis</i> - 2,9% de flavonoides em <i>P. alata</i> e 4% em <i>P. edulis</i>
Santos et al.	2006	<i>P. actinia</i>	folhas	metanólico; fração hexânica; fração clorofórmio; aquoso; frações cromatogr. A a C	experimental; camundongos; metanólico: 100,300 e 600 mg/kg CHCl ₃ , hexânica e aquoso: 30, 100 e 300 mg/kg frações cromatogr.: 10, 30, 100 mg/kg	ip	- labirinto em cruz elevado - teste do campo aberto	- metanólico (300 e 600 mg/kg) ↓ entrada e tempo nos braços abertos, e levantamentos e cruzamentos no campo aberto (efeito sedativo) - frações A,B,C: ↓ atividade geral - aquoso (30 mg/kg): efeito ansiolítico seletivo - efeito ansiolítico e sedativo na dependência do tipo de extrato e da dose
Castro et al.	2007	<i>P. quadrangularis</i>	folhas	aquoso e hidroetanólico	fitoquímica e experimental; ratos e camundongos; aquoso: 100,500 e 1000 mg/kg hidroetanólico: 100, 250, 500 mg/kg	oral	- avaliação farmacológica geral - labirinto em cruz elevado - teste do campo aberto - teste da placa perfurada	- flavonoides, alcaloides, taninos e saponinas em ambos os extratos - triterpenos e esteroides só no hidroetanólico - avaliação geral: doses maiores causaram apatia, mas a dose de 250 mg/kg do hidroetanólico ↑ a atividade - campo aberto: aquoso não promoveu alterações; hidroetanólico: ↓ congelamento e ↑ levantamento e ambulação periférica total - placa perfurada: hidroetanólico ↓ o

								tempo e o número de imersões de cabeça
Lolli, L.F. et al.	2007	<i>P. actinia</i>	folhas	metanólico e hidroetanólico	experimental; camundongos; doses metanólico (ME): 30, 100 e 300 mg/kg doses hidroetanólico (HE): 100, 300, 600 mg/kg agudo e repetido	oral	- labirinto em cruz elevado - sono induzido por pentobarbital - esquiva inibitória <i>step down</i> - teste do campo aberto	- tratamento agudo de HE (300 e 600 mg/kg) e ME (100 e 300 mg/kg): ↑ entrada e tempo nos braços abertos - flumazenil bloqueou os efeitos - trat. repetido ME: ↑ exploração nos braços abertos, mas HE não - ME e HE ↑ tempo de sono (ME +) - sem efeitos no <i>step down</i> - campo aberto: HE (300 mg/kg) ↓ levantamentos
Nassiri-Asl et al.	2007	<i>P. incarnata</i>	folhas, frutos e flores (juntos)	hidroetanólico	experimental camundongos BALB/c 0,05, 0,1, 0,2 e 0,4 mg/kg	ip	- convulsão por PTZ	- dose de 0,4 mg/kg ↑ latência e ↓ duração das convulsões - dose de 0,2 mg/kg apenas ↑ a latência - ação dose-dependente de proteção às convulsões - flumazenil reverteu os efeitos - naloxona reverteu os efeitos apenas na duração, não afetando a latência - papel importante dos receptores BZDs na ação anticonvulsivante e envolvimento de receptores opióides
Barbosa et al.	2008	<i>P. alata</i> <i>P. edulis</i>	folhas	aquoso	experimental; ratos; 25, 50, 100, 150 mg/kg	ip	- labirinto em cruz elevado - esquiva inibitória - campo aberto	- ambos os extratos ↑ o tempo de permanência nos braços abertos - ausência de efeitos sobre a esquiva inibitória - sem alterações no campo aberto - efeito tipo ansiolítico sem prejuízo de processos de memória
Grundmann	2008	<i>P. incarnata</i>	não	hidroetanólico	experimental;	oral	- labirinto em cruz	- presença dos flavonoides

et al.			indicado		camundongos; 150, 375 e 600 mg/kg		elevado - campo aberto - análise por HPLC	homoorientina, vitexina, isovitexina, orientina - ↑ tempo nos braços abertos do labirinto na dose de 375 mg/kg (curva em U invertido) - flumazenil bloqueou esse efeito e WAY-100635 não bloqueou o efeito - efeitos ansiolíticos mediados pelo sistema GABAérgico
--------	--	--	----------	--	---	--	---	--

Como pode ser observado pela análise da Tabela 2, existem atualmente 31 trabalhos disponíveis na literatura sobre possíveis propriedades neurofarmacológicas de espécies de *Passiflora*. Desses, apenas 1 trabalho foi realizado na década de 70, 2 na década de 80, 3 na década de 90 e 25 artigos foram publicados sobre o tema entre o ano de 2000 e o presente ano. A maioria das investigações diz respeito à espécie *P. incarnata* (17 artigos), seguido pela espécie *P. edulis* (10 artigos), *P. alata* (5 artigos), *P. actinia* (3 artigos) e apenas 1 artigo foi publicado sobre *P. quadrangularis*. Com relação à parte da planta usada, 14 artigos dizem respeito aos efeitos neurofarmacológicos de extratos obtidos a partir das folhas de tais espécies, sendo as demais partes da planta relegadas a um segundo plano. O extrato do tipo aquoso aparece como sendo o majoritário em tais investigações (17 trabalhos), bem como as investigações experimentais utilizando camundongos (21 trabalhos do total). Uma informação importante que surge da análise desta compilação é o fato de que, dos 31 trabalhos disponíveis, 14 foram realizados por grupos de pesquisas nacionais, ou entre grupos internacionais em parcerias com pesquisadores brasileiros.

Como pode ser observado, especificamente com relação à espécie *P. edulis*, suas propriedades neurofarmacológicas encontram-se bem documentadas na literatura, representando 10 trabalhos do total. Foram observados, para extratos provenientes desta espécie, efeitos hipno-sedativos (VALLE E LEITE, 1983; MALUF et al., 1991), atividade tipo-ansiolítica (PETRY et al., 2001; DE-PARIS et al., 2002; COLETA et al., 2006; REGINATTO et al., 2006; BARBOSA et al., 2008), bem como ausência de efeitos deletérios sobre processos de memória em animais experimentais (BARBOSA et al., 2008). No entanto, tais estudos referem-se aos efeitos das folhas desta espécie e existem poucos estudos, até o presente momento, sobre as propriedades neurofarmacológicas de outras partes da espécie *P. edulis*.

Do ponto de vista da constituição química, os principais compostos relatados na literatura para a espécie *P. edulis* são flavonoides, principalmente do tipo luteolina e apigenina (MARECK et al., 1990, 1991; PETRY, 1999), triterpenos (YOSHIKAWA et al., 2000a,b; ZUCOLOTTI et al., 2006), saponinas (BOMBARDELLI et al., 1975; YOSHIKAWA et al., 2000a,b) e alcaloides do tipo indólico (LUTOMSKI E MALEK, 1975; LUTOMSKI et al., 1975; LUTOMSKI E MALEK, 1976). No entanto, estudos com metodologias mais apuradas, através de cromatografia líquida de alta eficiência, não têm

permitido a detecção desses alcaloides em espécies de *Passiflora* (REHWALD et al., 1995), ou pelo menos não nas concentrações descritas em outros estudos (GRICE et al., 2001). Também foi relatada a presença de glicosídeos cianogênicos em todas as partes da espécie *P. edulis* Sims e na variedade *flavicarpa*, exceto nas sementes, embora os níveis diminuam com a maturação, não alcançando níveis suficientes para produzir toxicidade *in vivo* (SPENCER E SEIGLER, 1983).

A despeito do grande número de compostos relatados, as substâncias ativas responsáveis pelas atividades neurofarmacológicas observadas após o tratamento com extratos provenientes de espécies de *Passiflora* ainda não se encontram claramente identificadas. Alguns trabalhos sugerem que os flavonoides desempenhem um papel importante nos efeitos neurofarmacológicos de espécies como *P. incarnata* (ZANOLI et al., 2000), *P. coerulea* (WOLFMAN et al., 1994) e *P. edulis* (COLETA et al., 2006). Derivados de luteolina foram identificados e isolados a partir das folhas de *P. edulis* e associados aos efeitos tipo-ansiolíticos observados no teste do labirinto em cruz elevado (COLETA et al., 2006). O flavonoide crisina foi identificado e isolado a partir de *P. coerulea*, sendo classificado com um ligante de receptores benzodiazepínicos (MEDINA et al., 1989) e sua atividade tipo-ansiolítica foi demonstrada utilizando os testes do labirinto em cruz elevado e da placa perfurada, em camundongos (WOLFMAN et al., 1994) e ratos Sprague-Dawley (BROWN et al., 2007). BARBOSA e colaboradores (2008), os quais observaram um efeito tipo-ansiolítico após o tratamento com as folhas de *P. edulis* em ratos, afirmam que o conteúdo de flavonoides presentes no extrato dessas folhas parece ser quase o dobro do conteúdo de flavonoides presentes em *P. alata*, embora tais autores não tenham realizado uma avaliação qualitativa com o intuito de identificar tais compostos. O mesmo resultado já havia sido relatado seis anos antes por DE-PARIS e colaboradores (2002), os quais afirmam que o conteúdo de flavonoides encontrados nas folhas de *P. edulis* seria aproximadamente o dobro do encontrado nas folhas de *P. alata*. Portanto, fica evidente que, embora exista um grande número de estudos voltados à identificação dos prováveis compostos responsáveis pelas atividades neurofarmacológicas relatadas para espécies de *Passiflora*, e especificamente para a espécie *P. edulis*, ainda não existe um consenso sobre quais compostos poderiam estar relacionados a tais atividades centrais.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo inicial realizar uma investigação sobre a atividade neurofarmacológica potencial de diferentes partes da espécie vegetal *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener (*P. edulis*, maracujá). Posteriormente, em função dos resultados inicialmente obtidos, o objetivo deste trabalho passou a ser o de investigar a atividade neurofarmacológica do pericarpo (casca) dos frutos da espécie mencionada em camundongos, bem como elucidar os prováveis compostos ativos envolvidos em tal atividade, além dos possíveis mecanismos responsáveis pela ação neurofarmacológica.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar a atividade neurofarmacológica potencial dos extratos aquosos obtidos a partir das folhas, raízes e pericarpo de *P. edulis*, bem como do suco dos frutos, utilizando o teste da hipertermia induzida por estresse em camundongos.
- Investigar a atividade neurofarmacológica do extrato aquoso obtido a partir do pericarpo de *P. edulis*, bem como de suas frações butanólica e aquosa residual, em camundongos, utilizando os testes da transição claro-escuro, campo aberto, sono induzido por éter etílico, suspensão pela cauda e convulsões induzidas por pentilenotetrazol, com o objetivo de identificar em qual (quais) fração (ões) poderiam estar presentes os compostos responsáveis pela potencial atividade neurofarmacológica.
- Investigar a atividade neurofarmacológica dos flavonoides isolados a partir do pericarpo de *P. edulis*, utilizando os testes da transição claro-escuro e da suspensão pela cauda, para investigar os prováveis efeitos tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo, respectivamente.
- Investigar os possíveis mecanismos primários responsáveis pela ação neurofarmacológica dos flavonoides isolados a partir do pericarpo de *P. edulis*, utilizando antagonistas de alguns receptores farmacológicos em estudos *in vivo*.



MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos adultos, com peso entre 35 e 50 g e cerca de 12 semanas de idade, os quais foram mantidos em condições ambientais controladas: ciclo claro/escuro de 12 h, com luzes se acendendo às 7:00, e temperatura de 22 ± 2 °C. Os animais foram mantidos em caixas-moradia em número de 20 a 30 por caixa, com livre acesso a água e alimento, exceto durante as sessões-teste. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia até sua transferência para o Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia, uma semana antes dos experimentos, no mínimo. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com normas internacionais de bem-estar animal recomendadas pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Os protocolos experimentais utilizados foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob os números 23080.080072244/2006-70/CEUA/UFSC e 23080.057213/2008-21/CEUA/UFSC. É importante ressaltar que foi utilizado um número mínimo de animais, bem como um tempo mínimo de observação, necessários para a obtenção de resultados consistentes, de acordo com os preceitos éticos da Sociedade e Comitê acima mencionados.

3.2. Material vegetal

O material vegetal utilizado – folhas, raízes e frutos de *P. edulis* – foi coletado em região de cultivo no município de Antônio Carlos, estado de Santa Catarina, em janeiro de 2006. O material foi identificado pelo botânico Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, estando o material testemunho depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número FLOR 33886.

3.3. Obtenção dos extratos, fracionamento, identificação e isolamento dos compostos

Todos os procedimentos de extração, fracionamento, identificação e isolamento dos compostos utilizados nesta tese foram

realizados pela doutoranda Silvana Zucolotto Langassner, sob orientação do Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, do Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina, e fazem parte da tese de doutoramento da referida aluna.

3.3.1. Obtenção dos extratos aquosos das raízes, folhas e do suco dos frutos de *P. edulis*

As folhas e as raízes foram secas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor, e foram moídas em moinho de facas. Os extratos foram preparados por infusão, na qual os materiais vegetais (proporção 1:10, droga vegetal: água, p/v) foram deixados em contato com água quente (temperatura em torno de 90°C) por 10 min. Após esse período os extratos foram filtrados e liofilizados, obtendo-se o extrato aquoso liofilizado das folhas e das raízes.

Para a preparação do suco, a polpa foi separada das sementes com o auxílio de um coador e liofilizada em seguida, obtendo-se o suco liofilizado de *P. edulis*.

3.3.2. Obtenção do extrato e frações do pericarpo dos frutos de *P. edulis*

Para o preparo do extrato e frações do pericarpo de *P. edulis*, foram utilizados frutos maduros *in natura*. A polpa e as sementes dos frutos foram separadas do pericarpo. O extrato do pericarpo foi preparado na forma de infusão, na qual o material vegetal (500 g) foi deixado em contato com água quente (1500 ml, 90 °C) por 10 min e filtrado. Parte do extrato foi liofilizado, obtendo-se o extrato aquoso (EA) liofilizado do pericarpo, e o restante do extrato aquoso foi particionado com *n*-butanol (3 x 300 ml), obtendo-se a fração butanólica (FB) e a fração aquosa residual (FAR).

3.3.3. Análise qualitativa do extrato e frações do pericarpo dos frutos de *P. edulis*

A composição química dos extratos do pericarpo de *P. edulis*, bem como de suas frações derivadas, foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a análise por CCD, utilizou-se acetato de etila: ácido fórmico: água (80:10:10, v/v/v), como fase móvel, e gel de sílica F₂₅₄, como adsorvente; para detecção utilizou-se Reagente Natural A/PEG,

com visualização sob luz ultra-violeta (UV) 360 nm. O equipamento CLAE utilizado para essa análise qualitativa apresenta as seguintes características: Shimadzu SCL-10A, com detector UV SPD-10AV. Em relação às condições analíticas, utilizou-se uma coluna Luna RP C18, 5 µm (150 mm x 4,6 mm de diâmetro) (Phenomenex®), com fase móvel composta pelo solvente A [tetrahidrofurano: isopropanol: acetonitrila (10:2:3)] e solvente B (ácido fosfórico 0,5%). A separação foi realizada através de uma eluição isocrática (0-60 min 12% A em B). O fluxo utilizado foi 1 ml/min e detecção por UV em 340 nm.

3.3.4. Processo de obtenção da isoorientina isolada e da fração sem isoorientina

A C-glicosilflavona isoorientina foi obtida por sucessivos processos cromatográficos, conforme descrito previamente (ZUCOLOTTI et al., 2009). A análise por CLAE indicou uma pureza do composto ≥ 96 %.

No processo de fracionamento para obtenção da sub-fração do pericarpo sem isoorientina, a fração butanólica (800 mg) do pericarpo de *P. edulis* foi submetida à coluna tipo *flash*, utilizando como fase móvel um gradiente de acetato de etila (AcOEt), AcOEt: metanol (MeOH) (90:10), AcOEt: MeOH (80:20), AcOEt: MeOH (70:30), AcOEt: MeOH (60:40), AcOEt: MeOH (50:50), AcOEt: MeOH (40:60), AcOEt: MeOH (30:70), AcOEt: MeOH (20:80), AcOEt: MeOH (10:90) até MeOH. Para cada gradiente foi utilizado um volume de 250 ml de solvente. As sub-frações foram secas sob pressão reduzida em evaporador rotatório e, através de análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), foram reunidas, resultando em 4 frações principais (sub-frações A-D). A sub-fração denominada C (510 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica (sílica, 0.063–0.2mm), utilizando acetato de etila: acetona: ácido acético: água (6:2:1:1, v/v/v/v), como fase móvel, e fluxo 2,5 ml. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme semelhança. A fração 45-70 (43 mg) foi submetida a nova purificação por coluna em Sephadex LH-20, utilizando metanol como solvente, e fluxo de 1 ml/min, resultando em uma sub-fração sem a presença de isoorientina. Nesta sub-fração foi identificada a presença de vicenina-2, crisina 6,8-di-C-glicopiranosídeo e, em menor quantidade, o composto spinosina.

A C-glicosilflavona isoorientina e a sub-fração sem isoorientina foram analisadas por CLAE. O cromatógrafo utilizado para essa análise

apresenta as seguintes características: PerkinElmer (Series 200 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), equipado com detector de arranjo de diodos, bomba quaternária, desgaseificador e injetor automático. As condições analíticas utilizadas foram: coluna Luna RP C18, 5 µm (150 mm × 4,6 mm de diâmetro) (Phenomenex®), com fase móvel composta pelo solvente A [tetrahidrofurano: isopropanol: acetonitrila (10:2:3)] e solvente B (ácido fosfórico 0,5 %). A separação foi realizada através de uma eluição isocrática (0-60 min 12 % A em B). O fluxo utilizado foi 1 ml/min e detecção por UV em 340 nm.

Foram utilizados para identificação as amostras autênticas de isoorientina, vicianina-2 e crisina 6,8-di-*C*-glicopiranosídeo, isolados e identificados em laboratório através de dados espectroscópicos de UV e ressonância magnética nuclear (RMN) (ZUCOLOTTO et al., 2009). Os picos foram identificados pelo tempo de retenção, co-injeção com amostra autêntica e por comparação dos espectros de UV.

3.4. Drogas e soluções

As seguintes drogas foram utilizadas ao longo deste trabalho:

- **Buspirona HCl** (RBI – Research Biochemicals Incorporated, Natick, MA, USA), agonista pleno de receptores 5-HT_{1A} autossômicos e parcial de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos, diluída em solução salina (NaCl 0,9%), utilizada como controle positivo no teste da transição claro-escuro;
- **Diazepam** (Dienpax®, Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP, Brasil), agonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, diluído em solução salina (NaCl 0,9%), utilizado como controle positivo nos testes da hipertermia induzida por estresse, da transição claro-escuro e das convulsões induzidas por pentilenotetrazol;
- **Éter etílico** (F. Maia Indústria e Comércio Ltda., Cotia, SP, Brasil), utilizado para induzir o sono em camundongos;
- **Flumazenil** (Tocris, MO, USA), antagonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%), utilizado para bloquear o efeito do diazepam e investigar o possível mecanismo de ação GABAérgico dos compostos testados;
- **Imipramina HCl** (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina, dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%), utilizada como controle positivo no teste da suspensão pela cauda;

- **Pentilenotetrazol** (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), antagonista do sítio da picrotoxina do receptor GABA_A, dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%), utilizado para induzir convulsões experimentais;
- ***p*-clorofenilalanina metil éster** (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, USA), inibidor da síntese de serotonina, dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%), utilizado para bloquear o efeito da imipramina no teste da suspensão pela cauda;
- **Prazosina** (RBI – Research Biochemicals Incorporated, Natick, MA, USA), antagonista α 1-adrenérgico, dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%), utilizado para bloquear o efeito da imipramina no teste da suspensão pela cauda;
- **WAY-100635** (Sigma Aldrich, USA), antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%), utilizado para bloquear o efeito da buspirona no teste da transição claro-escuro.

3.5. Delineamento experimental

O presente trabalho foi desenvolvido de acordo com o delineamento experimental geral indicado na Figura 2.

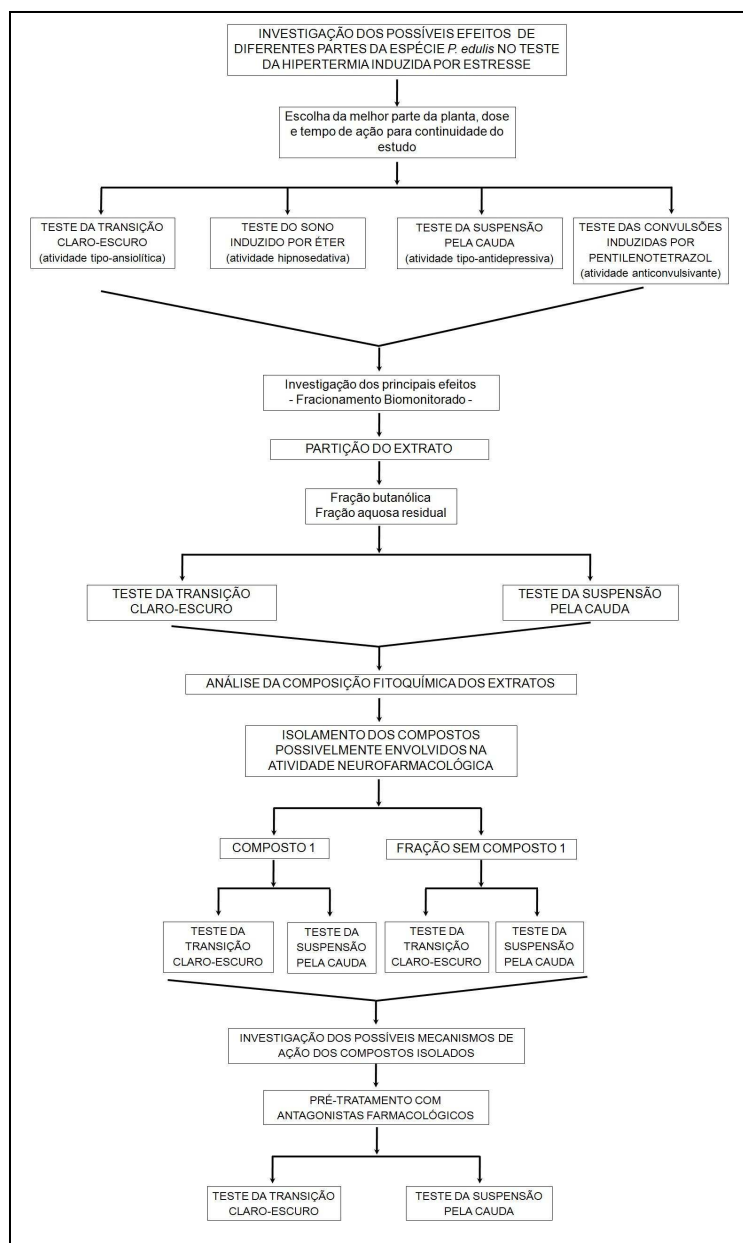


Figura 2 – Delineamento experimental geral do presente trabalho.

3.6. Testes farmacológicos

3.6.1. Teste da Hipertermia Induzida por Estresse em Animais Isolados

3.6.1.1. Padronização

Em sua proposição original (LECCI et al., 1990), o teste da hipertermia induzida por estresse (HIE) mostrava-se muito trabalhoso e, mais importante, necessitava de uma quantidade extremamente grande de animais experimentais. Em vista desses inconvenientes, buscou-se uma alternativa para a realização do teste. No trabalho de validação do teste de HIE em animais isolados (VAN DER HEYDEN et al., 1997), os autores verificaram os efeitos de diferentes tipos de estressores sobre a temperatura retal de camundongos, tais como distúrbio tátil (tocar os animais previamente à medição), imobilidade, estímulo acústico, eletrochoque nas patas e o próprio evento de medir a temperatura. Os autores demonstraram que o simples ato de medir a temperatura retal dos animais representava um estressor capaz de elevar a temperatura de maneira significativa.

Considerando tais aspectos, foi realizado, nesta tese, um experimento de padronização procurando validar o modelo da HIE em animais isolados considerando a própria medida de temperatura retal como evento estressor capaz de elevar a temperatura dos animais. Como controle foi utilizado o veículo de solubilização de tais drogas, solução salina. Além de validar o modelo com relação à sua metodologia em nosso laboratório, tal experimento constituiu-se, também, em uma oportunidade para verificar os efeitos de diferentes vias de administração, via oral (v.o.) ou intraperitoneal (i.p.), sobre a temperatura retal dos animais. Portanto, foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- grupo não-tratado (NT – animais tiveram suas temperaturas retais medidas sem nenhum tratamento ou manipulação prévia = *naive*)
- grupo tratado i.p. com salina
- grupo tratado v.o. com salina
- grupo tratado i.p. com diazepam (DZP - 1,5 mg/kg)
- grupo tratado v.o. com DZP (3 mg/kg)

O delineamento experimental seguido está representado na Figura 3:

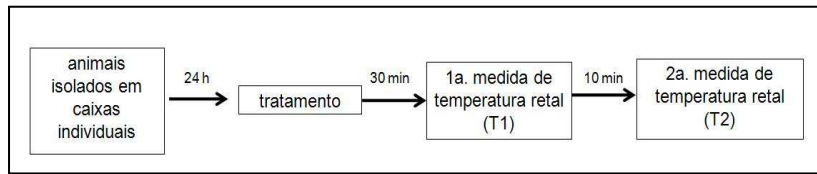


Figura 3 – Delineamento experimental seguido no experimento de padronização do teste da hipertermia induzida por estresse em animais isolados.

Como pode ser observado na Figura 3, os animais foram isolados em caixas individuais e, 24 h após, foram tratados v.o. ou i.p. (0,1 ml/10 g). Após 30 min do tratamento, os animais tiveram suas temperaturas retais medidas (T1) com o auxílio de um *probe* de registro de temperatura, o qual foi inserido no reto do animal a uma profundidade de 2 cm, e que se encontrava conectado a um termômetro digital (*Thermistor Thermometer* Modelo 8402-00, Cole-Parmer Instrument Company). O *probe* era retirado após estabilização da temperatura, em um tempo de aproximadamente 20 s. Após 10 min da primeira medida, procedeu-se a segunda medida (T2), em procedimento idêntico ao mencionado em T1. Os dados obtidos foram representados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos valores reais de temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Os dados obtidos em T1 foram analisados por análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Dunnett, para verificar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a temperatura retal dos animais. Uma segunda análise foi realizada entre os valores de T1 e T2 para verificar o efeito do procedimento de medida na temperatura dos animais. Neste último caso, os dados foram analisados por meio de ANOVA para medidas repetidas, seguido pelo teste de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

3.6.1.2. Investigação dos efeitos dos extratos vegetais sobre a HIE

Após a padronização, o teste da HIE foi utilizado para investigar os possíveis efeitos centrais de extratos provenientes de diferentes partes da espécie *P. edulis*, de acordo com o delineamento experimental indicado na Figura 4.

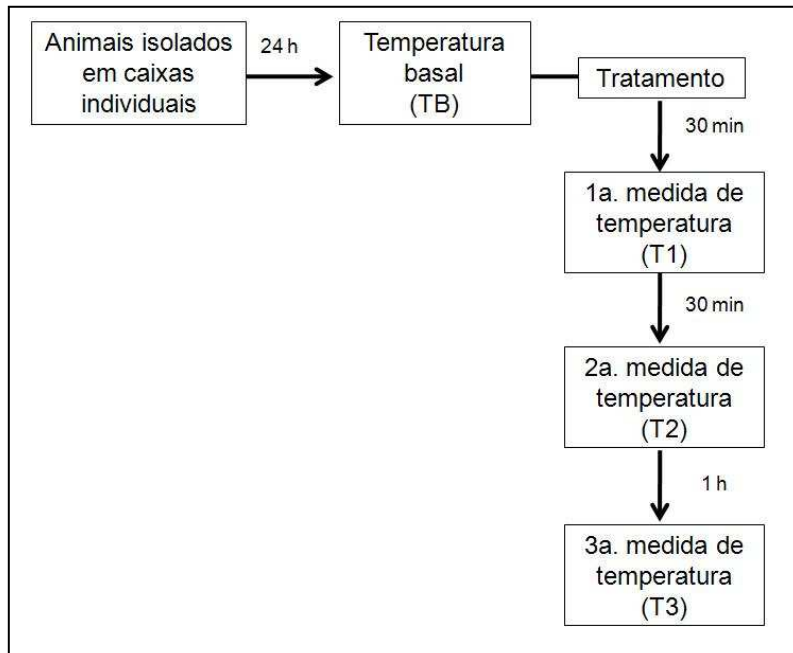


Figura 4 – Delineamento experimental seguido no experimento de investigação dos efeitos de diferentes partes da espécie *P. edulis* no teste da hipertermia induzida por estresse em animais isolados.

Como pode ser observado na figura acima, os animais foram isolados em caixas individuais e, 24 h após, tiveram suas temperaturas retais basais (TB) medidas de acordo com o procedimento descrito no item 3.6.1.1. Imediatamente após a medida de TB, diferentes grupos de animais foram tratados por via oral com doses de 100, 300, 600 ou 1000 mg/kg dos extratos aquosos obtidos a partir das raízes, folhas, pericarpo

ou do suco obtido dos frutos de *P. edulis*. Os animais do grupo controle receberam salina e os do grupo controle positivo receberam DZP (3 mg/kg, v.o.), droga-padrão utilizada na clínica como ansiolítica. Trinta minutos após o tratamento, foi realizada a primeira medida da temperatura retal (T1). Trinta minutos após T1 e, portanto, 1 h após o tratamento, foi realizada a segunda medida da temperatura (T2) e, 1 h após T2, a terceira medida foi realizada (T3). Os dados obtidos foram representados como média \pm e.p.m. dos valores reais de temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Para comparação entre os diferentes tempos, os dados foram analisados por meio de ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo teste de Newman-Keuls. Já para cada um dos tempos, os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo teste de Dunnett. Os valores foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

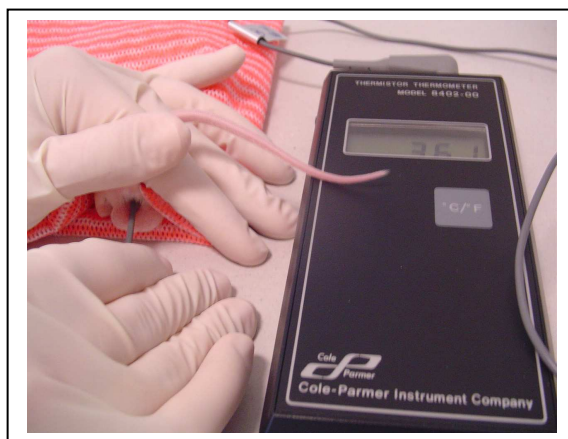


Figura 5 – Procedimento de medição da temperatura retal utilizado no teste da hipertermia induzida por estresse em animais isolados. Foto dos arquivos do Laboratório de Neurofarmacologia – UFSC.

3.6.2. Teste do Sono Induzido por Éter Etílico

Proposto por VIEIRA (2001), o teste do sono induzido por éter etílico foi utilizado para avaliar a potencial atividade hipno-sedativa do EA obtido a partir do pericarpo de *P. edulis*. Neste teste, os animais foram tratados por via oral com o EA nas doses de 100 ou 300 mg/kg e, 1 h após o tratamento, foram colocados individualmente em uma câmara de vidro transparente (30 x 20 cm) saturada com éter etílico (5 ml, 5 min para saturação). A saturação ocorreu pelo umedecimento de uma bola de algodão de tamanho padrão com o éter etílico, colocada em uma plataforma localizada a 20 cm de altura em relação à base da câmara. Os seguintes parâmetros foram registrados: latência para a perda do reflexo postural e tempo total de duração do sono (em segundos). O início do sono foi considerado a partir da perda do reflexo postural, terminando com a recuperação deste reflexo. Após a perda do reflexo postural, esperou-se 1 min para retirada de cada animal da câmara e, em seguida, cada animal foi colocado em decúbito dorsal para registro do tempo total de sono. O delineamento experimental deste teste está representado na Figura 6. Foi utilizado o DZP na dose de 1 mg/kg (30 min, v.o.) como controle positivo e solução salina (NaCl 0,9%) como controle. Os dados obtidos foram representados como média \pm e.p.m. dos tempos observados e analisados utilizando-se ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett, quando necessário, ou teste t de Student (controle positivo \times controle), sendo considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

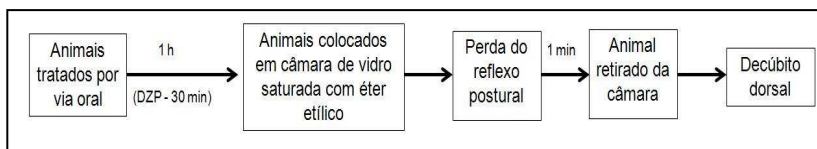


Figura 6 – Delineamento experimental seguido no experimento de investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis* no teste do sono induzido por éter etílico.

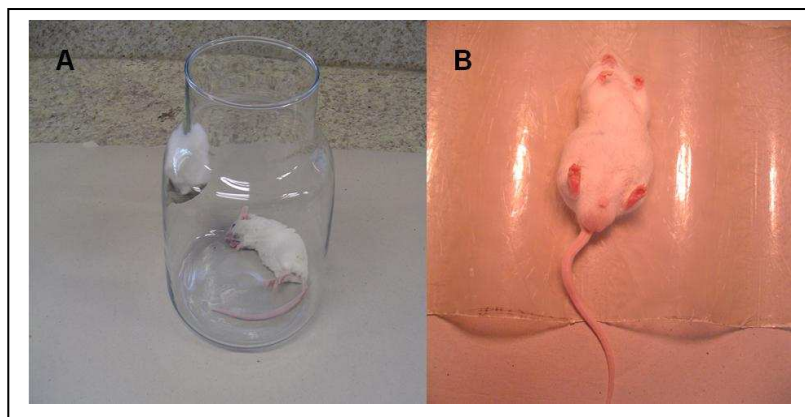


Figura 7 – Teste do sono induzido por éter etílico. A) Animal com perda de reflexo postural no interior da câmara de vidro (tampa aberta apenas para finalidade ilustrativa, permanecendo fechada até a perda do reflexo). B) Animal em decúbito dorsal para registro do tempo total do sono. Fotos do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – UFSC.

3.6.3. Teste das Convulsões Induzidas por Pentilenotetrazol

O teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) é considerado o principal teste experimental agudo para avaliação preliminar de drogas com potencial atividade anticonvulsivante (SWINYARD et al., 1952). Nesse teste, os animais foram tratados por via i.p. com PTZ na dose de 80 mg/kg, 1 h após o tratamento oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* ou com o veículo (salina), ou 30 min após o tratamento com a droga-padrão DZP (3 mg/kg, v.o.). Imediatamente após o tratamento com PTZ, os animais foram colocados em caixas individuais de observação, onde os seguintes parâmetros foram registrados durante o tempo total de 30 min: tempo de latência para a ocorrência da primeira convulsão clônica; duração desta convulsão; e severidade das convulsões, avaliada por meio da somatória do total de escores atribuídos (1= abalos mioclônicos; 2= convulsão clônica sem perda do reflexo postural; 3= convulsão clônica com perda do reflexo postural; 4= convulsão tônica sem morte, e 5= convulsão tônica seguida de morte, de acordo com a escala proposta por CZUCZWAR e FREY em 1986). Os dados obtidos referentes aos parâmetros latência para a ocorrência da primeira convulsão clônica e duração desta convulsão foram representados como média \pm e.p.m. dos tempos registrados e

analisados utilizando-se ANOVA de uma via ou teste t de Student (controle positivo \times controle). Já os dados referentes ao parâmetro severidade das convulsões foram representados como mediana \pm intervalo interquartil dos escores atribuídos e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ou pelo teste de Mann-Whitney (controle positivo \times controle). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. O delineamento experimental utilizado no teste das convulsões induzidas por PTZ está representado na Figura 8.

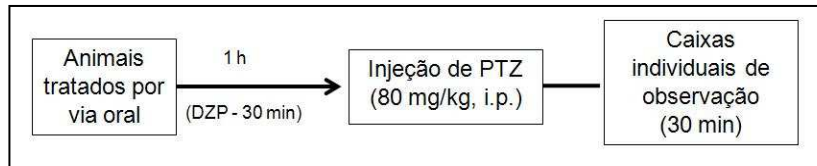


Figura 8 – Delineamento experimental seguido no experimento de investigação do efeito do extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis* no teste das convulsões induzidas por PTZ.

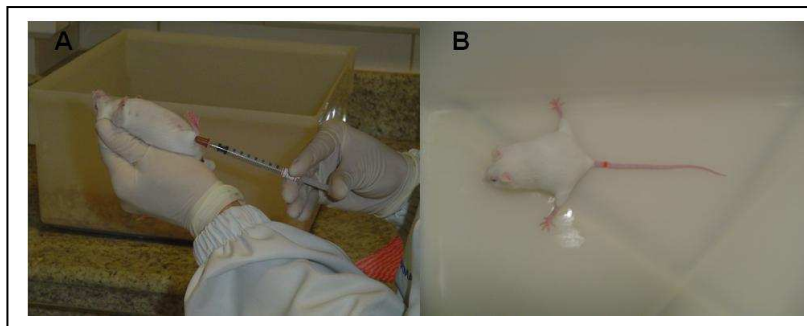


Figura 9 – Teste das convulsões induzidas por PTZ. A) Animal sendo tratado com PTZ (80 mg/kg, i.p.); B) Animal apresentando um abalo mioclônico após a injeção de PTZ. Fotos do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – UFSC.

3.6.4. Testes da Transição Claro-Escuro e do Campo Aberto

O teste da transição claro-escuro foi inicialmente desenvolvido por CRAWLEY E GOODWIN em 1980 e, atualmente, é um teste amplamente validado e utilizado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. O aparato é constituído por uma caixa construída em acrílico, com dimensões de 45 x 27 x 27 cm, dividida em dois compartimentos: um de cor branca, representando 2/3 do tamanho total da caixa e altamente iluminado (400 lux), e um compartimento pintado de preto e sem iluminação, representando 1/3 do tamanho total. Os compartimentos são conectados entre si por meio de uma abertura (5 X 5 cm). Os animais foram colocados no centro do compartimento claro com a cabeça voltada para a porta divisória e observados durante 5 min após a primeira entrada no compartimento escuro. Foram considerados para análise: o número de transições entre os compartimentos e o tempo total de permanência dos animais no compartimento claro da caixa, em segundos.

Imediatamente após o teste da transição claro-escuro, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre seu comportamento motor. O aparato é constituído por uma caixa de acrílico, de 35 x 35 cm, com piso dividido em 9 quadrantes e paredes de acrílico transparente de 15 cm de altura. Os animais foram, individualmente, colocados no centro do aparato para registro dos seguintes parâmetros, durante um tempo de observação de 5 min: número total de áreas percorridas e número de levantamentos.

O teste da transição claro-escuro, seguido pelo campo aberto, foi utilizado nesta tese em cinco etapas distintas.

Primeira etapa: avaliação da possível atividade tipo-ansiolítica do EA obtido a partir do pericarpo dos frutos de *P. edulis*.

Segunda etapa: avaliação do possível efeito tipo-ansiolítico da FB e da FAR obtidas a partir do EA do pericarpo de *P. edulis*.

Terceira etapa: avaliação da possível atividade tipo-ansiolítica do flavonóide C-glicosídeo isoorientina e da fração de flavonóides sem isoorientina (FF) obtidas a partir do pericarpo de *P. edulis*.

Quarta etapa: avaliação do envolvimento do sistema GABA-sítio benzodiazepínico na potencial atividade tipo-ansiolítica da isoorientina.

Quinta etapa: avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico na potencial atividade tipo-ansiolítica da isoorientina.

O delineamento experimental empregado na primeira, segunda e terceira etapas está representado na Figura 10. Nestas etapas, os animais foram tratados por v.o. com os compostos em teste, salina ou DZP e, 1 h após (ou 30 min, no caso do DZP), foram submetidos ao teste da transição claro-escuro.

O delineamento experimental da quarta e quinta etapas está representado esquematicamente na Figura 11. Na quarta etapa, os animais foram pré-tratados com salina ou flumazenil (FMZ – 1 mg/kg, i.p.) e, 15 min após, foram tratados por v.o. com a isoorientina (10 mg/kg), salina ou DZP (2 mg/kg). Uma hora após o tratamento oral, os animais foram submetidos ao teste da transição claro-escuro. Já na quinta etapa, os animais foram pré-tratados com salina ou WAY-100635 (WAY – 0,5 mg/kg, i.p.) e, 15 min após, foram tratados oralmente com isoorientina (10 mg/kg), salina ou bupiriona (BUSP - 10 mg/kg). Uma hora após o tratamento oral, os animais foram avaliados no teste da transição claro-escuro.

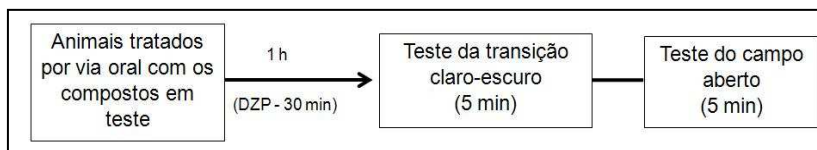


Figura 10 – Delineamento experimental seguido nos experimentos de investigação do efeito do EA, FB, FAR, isoorientina e FF obtidos a partir do pericارpo de *P. edulis* no teste da transição claro-escuro.

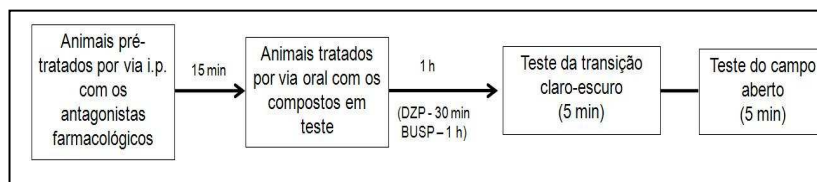


Figura 11 – Delineamento experimental seguido nos experimentos de investigação do envolvimento dos sistemas GABA-benzodiazepínico e serotoninérgico no possível efeito da isoorientina no teste da transição claro-escuro.

Os dados obtidos nas três primeiras etapas foram representados em média \pm e.p.m. e analisados utilizando-se ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett, quando necessário, ou teste t de Student (controle positivo \times controle). Já os dados obtidos na quarta e quinta etapas foram representados em média \pm e.p.m. e analisados utilizando-se ANOVA de duas vias, sendo o pré-tratamento e o tratamento as variáveis independentes, seguido pelo teste de Newman-Keuls quando indicado. Os dados foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

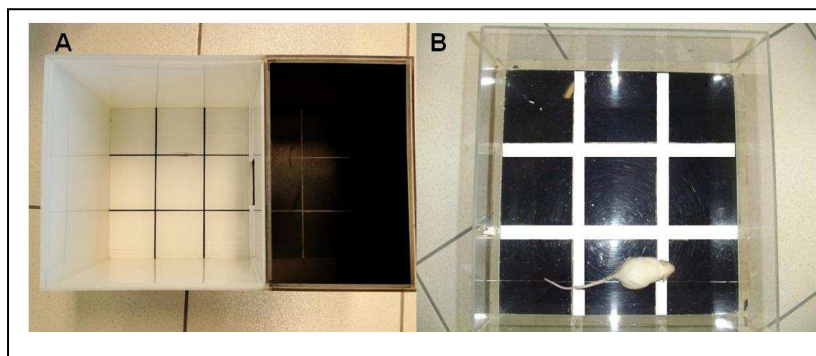


Figura 12 – A) Aparato utilizado no teste da transição claro-escuro. B) Aparato utilizado no teste do campo aberto. Fotos do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – UFSC.

3.6.5. Teste da Suspensão Pela Cauda

O teste da suspensão pela cauda é um dos testes animais mais amplamente utilizado para a avaliação e identificação de novos compostos com potencial ação antidepressiva (BOURIN et al., 2005; CRYAN et al., 2005). O procedimento empregado nesta tese foi similar ao descrito por STÉRU e colaboradores em 1985. Os animais foram fixados pela cauda, com o auxílio de fita adesiva, na bancada de experimentação, a uma altura de 70 cm do solo. Após a fixação, os animais foram observados individualmente durante 5 min, sendo registrados os seguintes parâmetros: tempo de latência para o início da

imobilidade (definida como a ausência total de movimentação do animal) e tempo total de imobilidade. Ambas as medidas foram registradas em segundos. A imipramina (IMI – 45 mg/kg), droga utilizada na clínica como antidepressiva, foi administrada aos animais do grupo controle positivo e salina aos do grupo controle.

De forma similar ao delineamento experimental utilizado no teste da transição claro-escuro, o teste da suspensão pela cauda foi empregado nesta tese em cinco etapas distintas.

Primeira etapa: avaliação da possível atividade tipo-antidepressiva do EA obtido a partir do pericarpo dos frutos de *P. edulis*.

Segunda etapa: avaliação do possível efeito tipo-antidepressivo da FB e da FAR obtidas a partir do EA do pericarpo dos frutos de *P. edulis*.

Terceira etapa: avaliação da possível atividade tipo-antidepressiva da isoorientina e da FF obtidas a partir do pericarpo de *P. edulis*.

Quarta etapa: avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico na possível atividade tipo-antidepressiva da isoorientina.

Quinta etapa: avaliação do envolvimento do sistema noradrenérgico na possível atividade tipo-antidepressiva da isoorientina.

O delineamento experimental empregado na primeira, segunda e terceira etapas está representado na Figura 13. Nestas etapas, os animais foram tratados por via oral com os compostos em teste, salina ou imipramina e, 1 h após, foram submetidos ao teste da suspensão pela cauda.

O delineamento experimental da quarta e quinta etapas estão representados nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Na quarta etapa, os animais foram pré-tratados por via i.p. com salina ou *p*-clorofenilalanina (PCPA – 100 mg/kg), durante 4 dias. Após 30 min do último pré-tratamento, os animais foram tratados oralmente com isoorientina (5 mg/kg), salina ou imipramina. Uma hora após o tratamento oral, os animais foram avaliados no teste da suspensão pela cauda. Na quinta etapa, os animais foram pré-tratados por via i.p. com salina ou prazosina (1 mg/kg) e, 30 min após, foram tratados por v.o. com isoorientina (5 mg/kg), salina ou imipramina. Uma hora após o tratamento oral, os animais foram avaliados no teste da suspensão pela cauda.

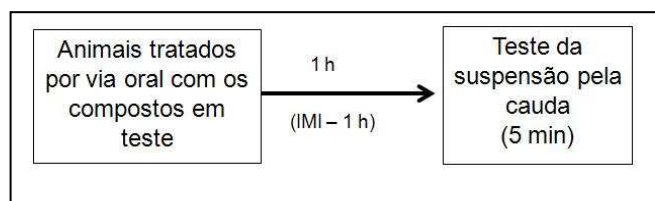


Figura 13 – Delineamento experimental seguido nos experimentos de investigação do efeito do EA, FB, FAR, isoorientina e FF obtidos a partir do pericarpo de *P. edulis* no teste da suspensão pela cauda.

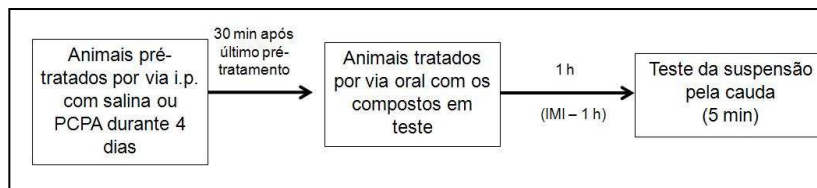


Figura 14 – Delineamento experimental seguido nos experimentos de investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico no possível efeito da isoorientina no teste da suspensão pela cauda.

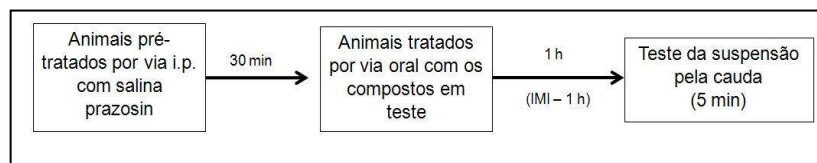


Figura 15 – Delineamento experimental seguido nos experimentos de investigação do envolvimento do sistema noradrenérgico no possível efeito da isoorientina no teste da suspensão pela cauda.

Os dados obtidos nas três primeiras etapas foram representados como média \pm e.p.m. e analisados utilizando-se ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett, quando necessário, ou teste t de Student (controle positivo \times controle). Já os dados obtidos na quarta e quinta etapas foram representados como média \pm e.p.m. e analisados

utilizando-se ANOVA de duas vias, sendo o pré-tratamento e o tratamento as variáveis independentes, seguida pelo teste de Newman-Keuls quando indicado. Os dados foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.



Figura 16 – Animal no teste da suspensão pela cauda. Fotos do arquivo do Laboratório de Neurofarmacologia – UFSC.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Padronização do teste da Hipertermia Induzida por Estresse (HIE)

Como pode ser observado na Figura 17, os tratamentos com salina, tanto por via oral quanto por via i.p., em T1, produziram um aumento significativo da temperatura retal dos animais, quando comparados ao grupo não tratado (NT). Já os tratamentos com DZP, também tanto por v.o. quanto por via i.p., impediram a ocorrência da hipertermia induzida pelo procedimento de tratamento, também quando comparados ao grupo NT, uma vez que não apresentaram elevações significativas da temperatura [$F(4,25)=7,47$; $p < 0,01$].

A ANOVA para medidas repetidas revelou um aumento significativo da temperatura retal dos animais do grupo NT e dos animais que receberam salina por via oral, em T2, quando comparadas às temperaturas desses mesmos grupos em T1. Além disso, os tratamentos com DZP, tanto por i.p. quanto por via oral, impediram a ocorrência da hipertermia, também quando comparados às temperaturas desses mesmos grupos em T1. O tratamento oral com DZP, além de impedir a elevação em T2, reduziu significativamente a temperatura quando comparada à temperatura desse mesmo grupo em T1 [$F(4,25)=14,22$; $p < 0,01$].

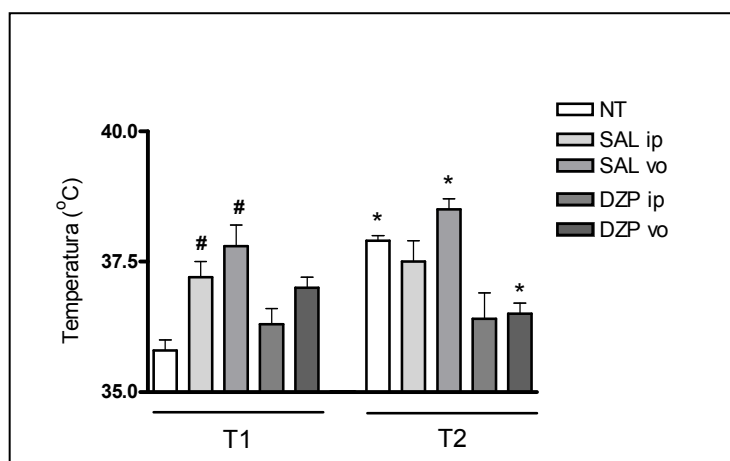


Figura 17 – Efeitos de diferentes vias de administração e diferentes tratamentos na temperatura retal dos animais no teste da hipertermia induzida por estresse em animais isolados. T1= medida da temperatura retal dos animais 30 min após o tratamento. T2= medida da temperatura retal dos animais 10 minutos após a medida de T1. NT= grupo não tratado; SAL ip= solução salina (NaCl 0,9%) via i.p.; SAL vo= solução salina (NaCl 0,9%) v.o.; DZP ip= diazepam 1,5 mg/kg i.p.; DZP vo= diazepam 3 mg/kg por v.o. Dados representados como média \pm e.p.m. N=6 animais/grupo. # indica diferença em relação ao grupo NT em T1 ($p < 0,01$; ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett). * indica diferença para o mesmo grupo de tratamento entre T1 e T2 ($p < 0,01$; ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

4.2. Efeito dos extratos de diferentes partes de *P. edulis* no teste da HIE

A Figura 18 mostra os efeitos do tratamento com o EA do pericarpo de *P. edulis* sobre a HIE. A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(5,39)=7,3$; $p < 0,01$], da repetição [$F(5,39)=5,9$; $p < 0,01$] e da interação entre os fatores [$F(5,39)=2,6$; $p < 0,01$]. Foi observado um aumento estatisticamente significativo na temperatura retal dos animais do grupo controle, em todos os tempos de observação, quando comparada à temperatura basal, indicando a presença de hipertermia induzida por estresse nesse grupo. Já os animais tratados com as diferentes doses do EA do pericarpo de *P. edulis*, bem como os tratados com DZP, não apresentaram alteração significativa da temperatura em nenhum dos tempos de observação, quando comparados às suas respectivas temperaturas basais.

Em T1, a ANOVA de 1 via indicou redução significativa da temperatura dos animais tratados com as doses de 600 e 1000 mg/kg do EA do pericarpo de *P. edulis*, de maneira similar ao que ocorreu com os animais tratados com a droga-padrão DZP [$F(5,39)=3,8$; $p < 0,01$], quando comparados aos animais do grupo controle. Em T2, a ANOVA de 1 via indicou redução significativa da temperatura dos animais tratados com todas as doses, de maneira similar ao que ocorreu com os animais tratados com o DZP [$F(5,39)=7,2$; $p < 0,01$], efeito este que foi mantido em T3 [$F(5,39)=7,9$; $p < 0,01$], também quando comparados ao grupo controle.

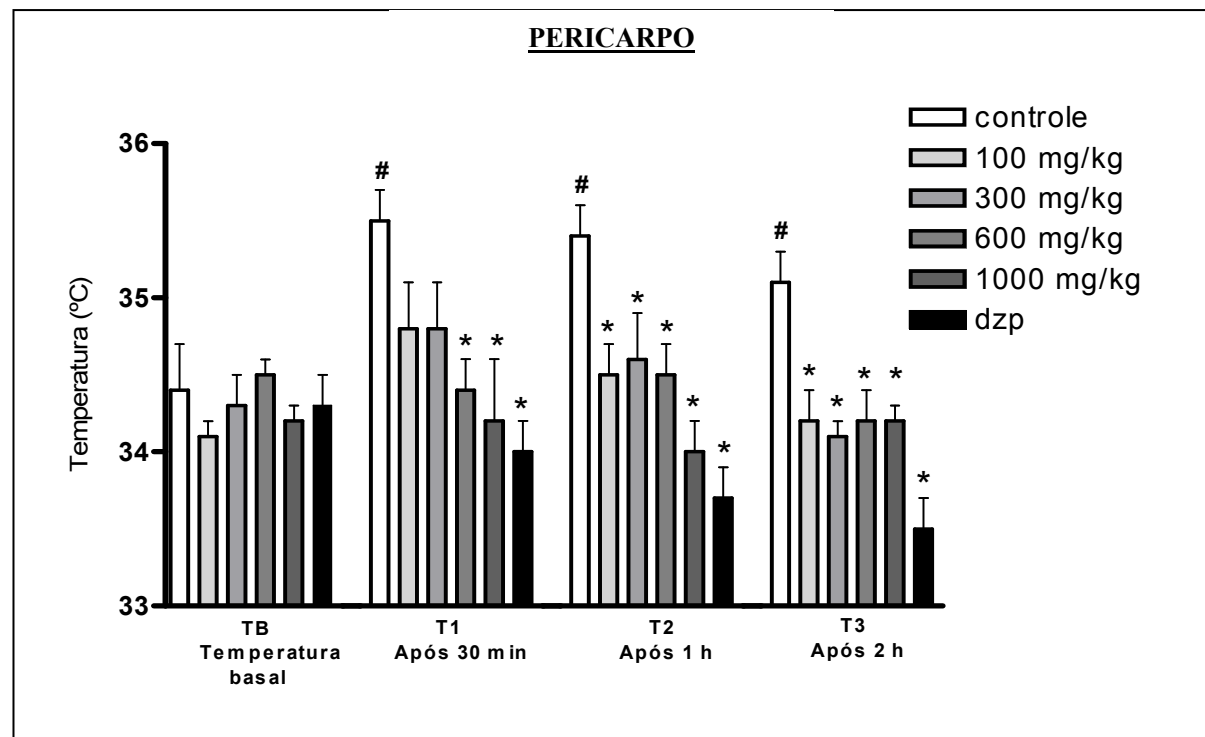


Figura 18 – Efeitos do tratamento por via oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* na hipertermia induzida por estresse em animais isolados. Dados representados como média \pm e.p.m. das temperaturas. N=7-8 animais/grupo. # indica diferença em relação à TB do grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls); * indica diferença estatística quando comparado ao grupo 73 controle em cada um dos tempos ($p < 0,01$; ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett). DZP = diazepam (3 mg/kg, v.o.).

A Figura 19 mostra os efeitos do tratamento com o suco dos frutos de *P. edulis* sobre a HIE. A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(5,36)=4,7$; $p < 0,01$], da repetição [$F(5,36)=11,7$; $p < 0,01$] e da interação entre os fatores [$F(5,36)=2,2$; $p < 0,01$]. Foi observado um aumento estatisticamente significativo na temperatura retal dos animais do grupo controle, em T1 e T2, quando comparada à temperatura basal, indicando a presença de hipertermia nesse grupo. Já os animais tratados com as diferentes doses do suco dos frutos de *P. edulis*, bem como os tratados com DZP, não apresentaram alteração significativa da temperatura em nenhum dos tempos de observação, quando comparados às suas respectivas temperaturas basais.

Em T1, a ANOVA de 1 via indicou redução significativa da temperatura apenas nos animais tratados com a dose de 1000 mg/kg do suco dos frutos de *P. edulis*, de maneira similar ao que ocorreu com os animais tratados com a droga-padrão DZP [$F(5,36)=3,6$; $p < 0,01$], quando comparados ao grupo controle. Em T2, a ANOVA de 1 via indicou redução significativa da temperatura dos animais tratados com as doses de 600 e 1000 mg/kg do suco dos frutos de *P. edulis*, de maneira similar ao que ocorreu com o grupo tratado com DZP [$F(5,36)=5,1$; $p < 0,01$]. Já em T3, a análise estatística indicou redução significativa da temperatura nas doses de 300 e 1000 mg/kg, enquanto a dose de 600 mg/kg apresentou apenas uma tendência à redução ($p = 0,06$) [$F(5,36)=3,2$; $p < 0,05$], quando comparados ao grupo controle.

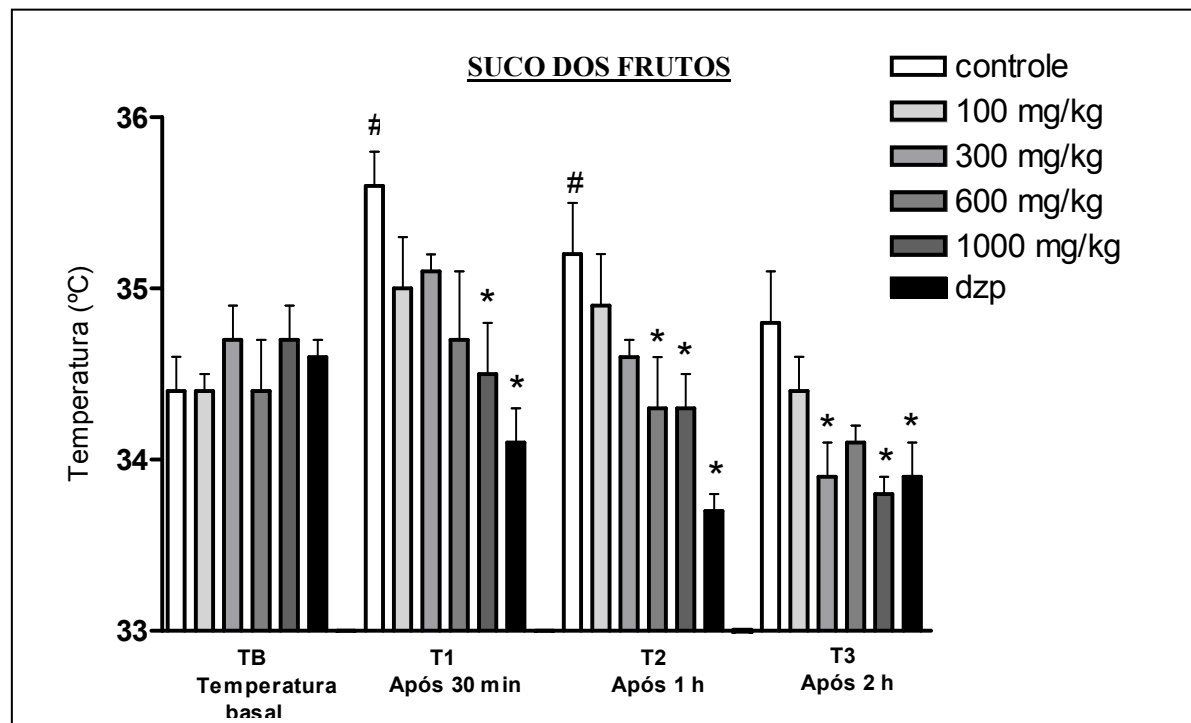


Figura 19 – Efeitos do tratamento por via oral com o suco dos frutos de *P. edulis* na hipertermia induzida por estresse em animais isolados. Dados representados como média \pm e.p.m. das temperaturas. N=7 animais/grupo. # indica diferença em relação à TB do grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls); * indica diferença estatística quando comparado ao grupo controle em cada um dos tempos ($p < 0,01$; ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett). DZP = diazepam (3 mg/kg, v.o.).

A Figura 20 mostra os efeitos do tratamento com o EA das folhas de *P. edulis* sobre a HIE. A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(5,42)=4,5$; $p < 0,01$], da repetição [$F(5,42)=3,5$; $p < 0,05$] e da interação entre os fatores [$F(5,42)=1,8$; $p < 0,05$]. Foi observado um aumento estatisticamente significativo na temperatura retal dos animais do grupo controle, em todos os tempos de observação, quando comparada à temperatura basal, indicando a ocorrência de hipertermia nesse grupo. Já os animais tratados com as diferentes doses do EA das folhas de *P. edulis*, bem como os tratados com DZP, não apresentaram alteração significativa da temperatura em nenhum dos tempos de observação, quando comparados às suas respectivas temperaturas basais.

Em T1, a ANOVA de 1 via indicou redução significativa da temperatura apenas dos animais tratados com a dose de 1000 mg/kg, de maneira similar ao que ocorreu com os animais tratados com DZP [$F(5,42)=4,7$; $p < 0,01$], quando comparados ao grupo controle. Em T2, a ANOVA de 1 via indicou redução significativa da temperatura dos animais tratados com as doses de 600 e 1000 mg/kg, também de maneira similar ao que ocorreu com os animais tratados com DZP [$F(5,42)=3,6$; $p < 0,01$], efeito este que foi mantido em T3 [$F(5,42)=4,7$; $p < 0,01$], quando comparados ao grupo controle.

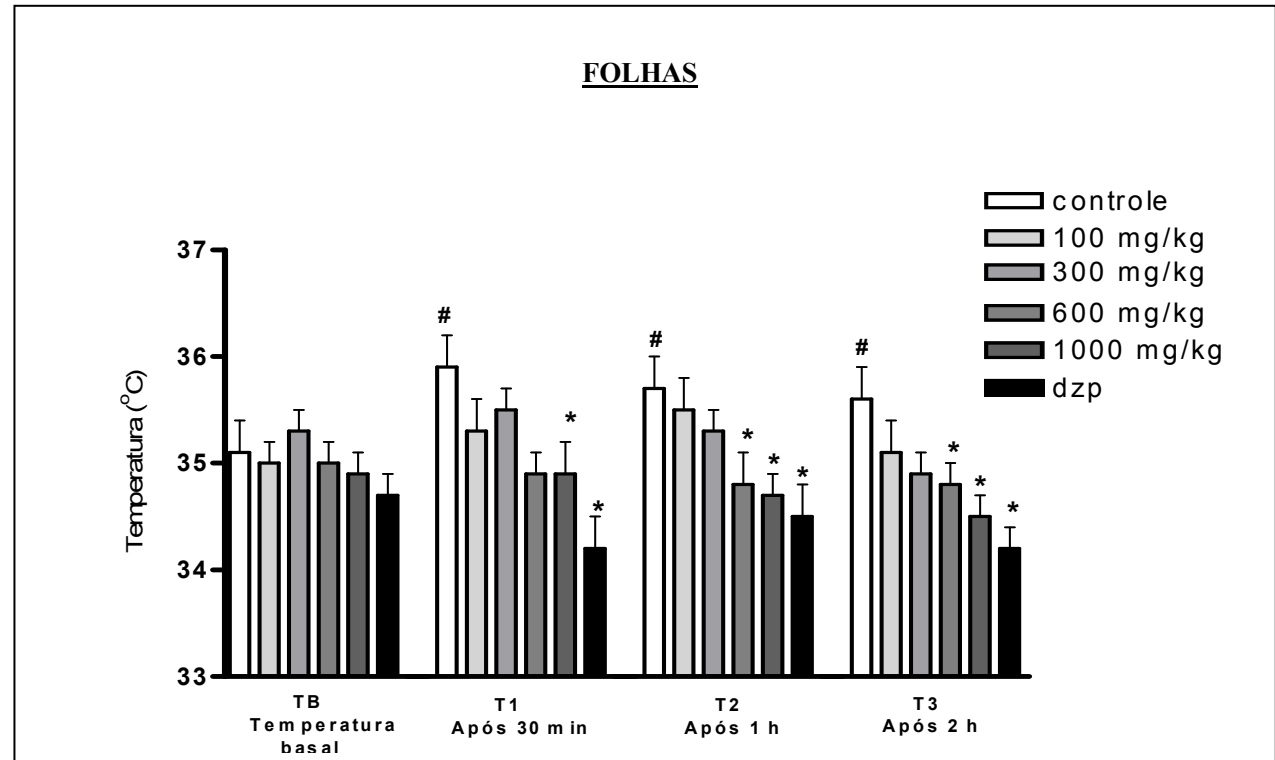


Figura 20 – Efeitos do tratamento por via oral com o EA das folhas de *P. edulis* na hipertermia induzida por estresse em animais isolados. Dados representados como média \pm e.p.m. das temperaturas. N=8 animais/grupo. # indica diferença em relação à TB do grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls); * indica diferença estatística quando comparado ao grupo controle em cada um dos tempos ($p < 0,01$; ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett). DZP = diazepam (3 mg/kg, v.o.).

Finalmente, a Figura 21 mostra os efeitos do tratamento com o EA das raízes de *P. edulis* sobre a HIE. A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(5,36)=2,7$; $p < 0,05$], da repetição [$F(5,36)=5,8$; $p < 0,01$] e da interação entre os fatores [$F(5,36)=1,9$; $p < 0,05$]. Foi observado um aumento estatisticamente significativo na temperatura retal dos animais do grupo controle em T1 e T2, quando comparada à temperatura basal, indicando a presença de hipertermia induzida por estresse nesse grupo, nesses tempos. Já os animais tratados com as diferentes doses do EA das raízes de *P. edulis*, bem como os tratados com DZP, não apresentaram alteração significativa da temperatura em nenhum dos tempos de observação, quando comparados às suas respectivas temperaturas basais.

Em T1, a ANOVA de 1 via indicou ausência de alterações significativas de temperatura em todos os grupos de tratamento, inclusive o grupo tratado com a droga-padrão DZP [$F(5,36)=1,7$; $p > 0,05$], quando comparados aos animais do grupo controle. Apenas a dose de 600 mg/kg apresentou tendência à diminuição da temperatura ($p = 0,06$). Em T2, a ANOVA de 1 via indicou redução significativa da temperatura apenas nos animais tratados com a dose de 1000 mg/kg, de maneira similar ao que ocorreu com os animais tratados com DZP [$F(5,36)=4,3$; $p < 0,01$]. Já em T3, a análise estatística indicou ausência de alterações significativas em todos os grupos de tratamento, quando comparados ao grupo controle [$F(5,36)=1,5$; $p > 0,05$].

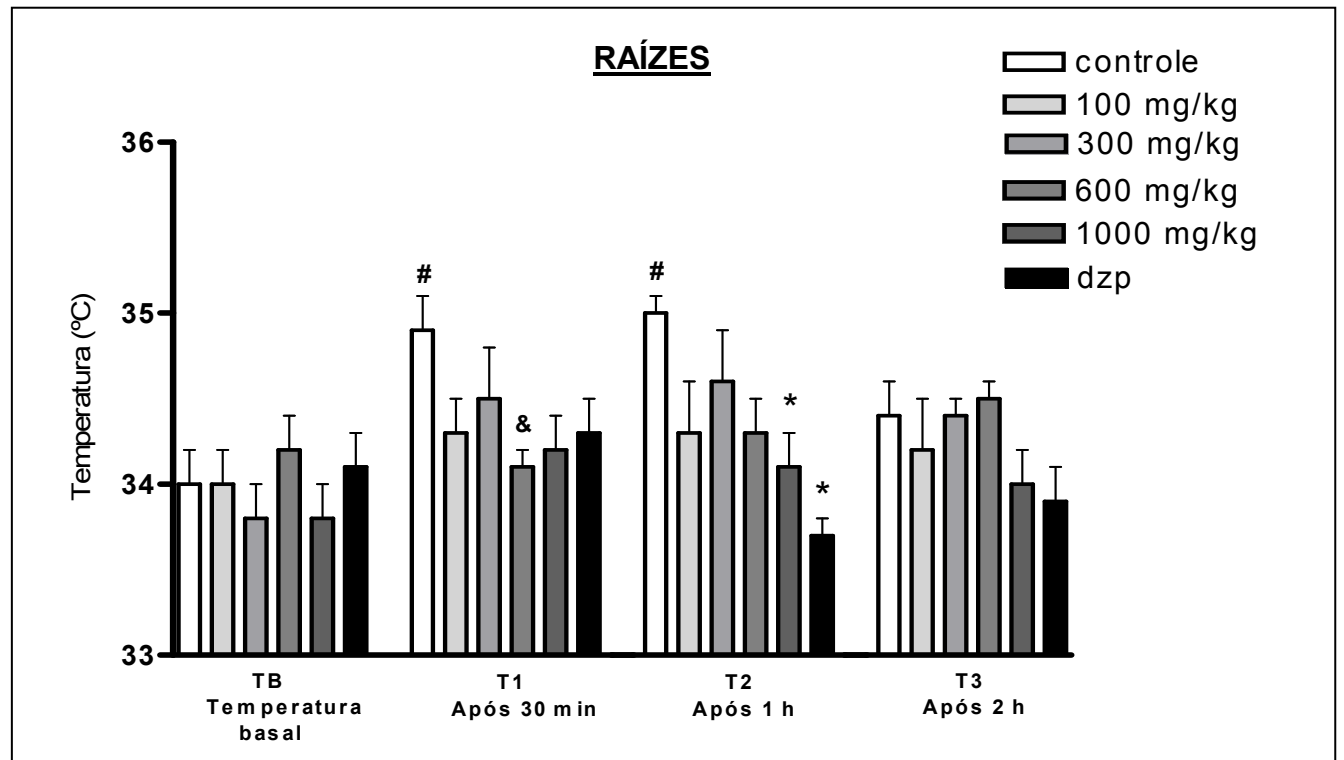


Figura 21 – Efeitos do tratamento por via oral com o EA das raízes de *P. edulis* na hipertermia induzida por estresse em animais isolados. Dados representados como média \pm e.p.m. das temperaturas. N=7 animais/grupo. # indica diferença em relação à TB do grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls); * indica diferença estatística quando comparado ao grupo controle em cada um dos tempos e & indica tendência à significância ($p=0,06$) ($p < 0,01$; ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett). DZP = diazepam (3 mg/kg. v.o.).

4.3. Efeitos neurofarmacológicos do EA do pericarpo de *P. edulis*

4.3.1. Teste do sono induzido por éter etílico

Como representado na Figura 22A, o tratamento por via oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* diminuiu significativamente, em ambas as doses testadas (100 e 300 mg/kg), o tempo de latência para o início do sono induzido por éter etílico, assim como o fez o tratamento com a droga-padrão DZP [$F(2,17)=9,54$; $p < 0,01$; $t(11)=2,21$; $p < 0,05$). No parâmetro tempo total de sono, a ANOVA de 1 via indicou um aumento significativo produzido pelo tratamento com ambas as doses do EA, quando comparado ao grupo controle, também de maneira similar ao produzido pelo DZP [$F(2,17)=4,65$; $p < 0,05$; $t(11)=-3,05$; $p < 0,05$].

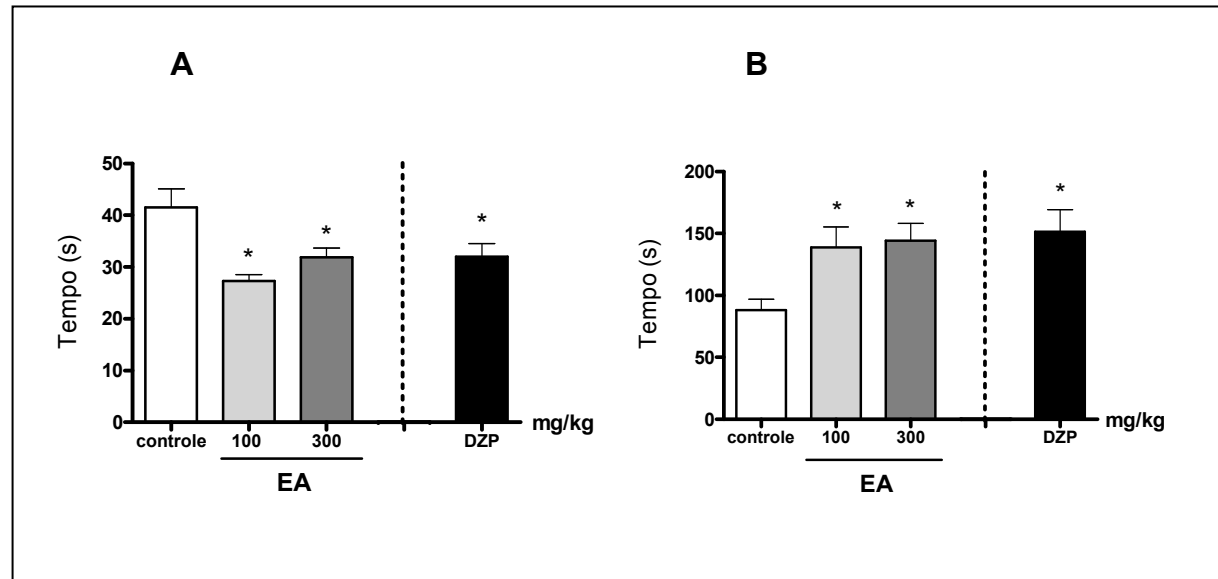


Figura 22 – Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* (100 e 300 mg/kg) no tempo de sono induzido por éter etílico em camundongos. A) latência para o início do sono. B) tempo total de sono. O diazepam (DZP), na dose de 1 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. N=6-7 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. *p < 0,05 contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do diazepam).

4.3.2. Teste das convulsões induzidas por PTZ

O tratamento por via oral com as doses de 100 e 300 mg/kg do EA do pericarpo de *P. edulis* não alterou nenhum dos parâmetros observados no teste das convulsões induzidas por PTZ, como representado na Figura 23. Apenas o grupo tratado com DZP na dose de 3 mg/kg apresentou um aumento significativo na latência para a primeira convulsão e diminuiu a severidade das convulsões [latência para primeira convulsão: $F(2,20)=1,12$; $p > 0,05$; $t(13)=-2,82$; $p < 0,05$; duração da primeira convulsão clônica: $F(2,20)=1,2$; $p > 0,05$; $t(13)=0,95$; $p > 0,05$; severidade das convulsões: $H_{23}(2)=4,1$; $p > 0,05$; $U=6,0$; $p < 0,05$].

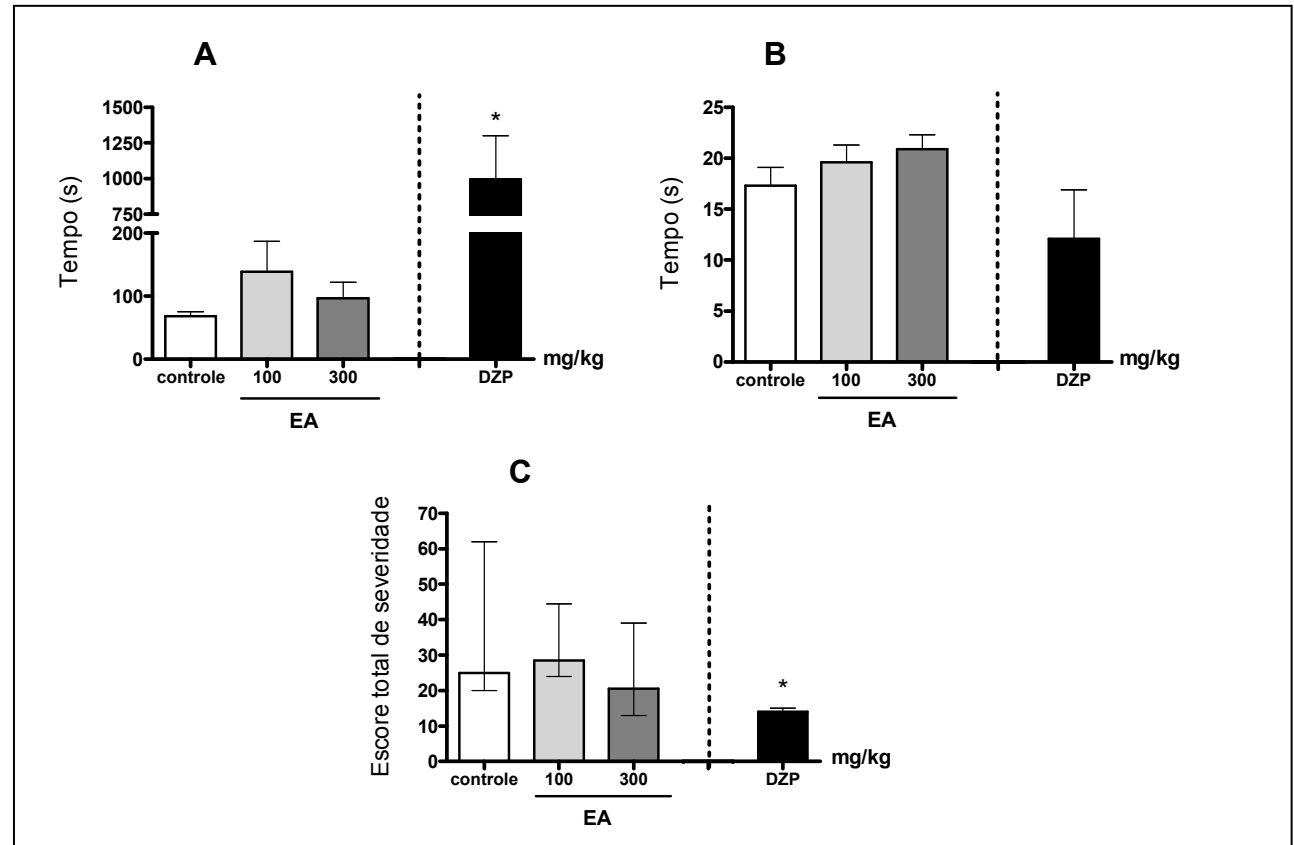


Figura 23 – Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* (100 e 300 mg/kg) nas convulsões induzidas por PTZ em camundongos. A) latência para a primeira convulsão. B) duração da primeira convulsão. C) grau de severidade das convulsões. Diazepam (DZP), 3 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. Em A e B os dados estão representados como média \pm e.p.m. Em C os dados estão representados como mediana \pm intervalo interquartil. N= 7-8 animais/grupo. * $p < 0,05$ contra o grupo controle (A e B: ANOVA de 1 via seguida por teste de Dunnett; teste t de Student para os dados do DZP; C: Teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Mann-Whitney; teste de Mann-Whitney para os dados do DZP).

4.3.3. Teste da transição claro-escuro e do campo aberto

A análise estatística revelou ausência de efeitos significativos no parâmetro número de transições entre compartimentos para as doses testadas do EA do pericarpo de *P. edulis* (100 e 300 mg/kg), como pode ser observado na Figura 24A, ao contrário do que foi observado após o tratamento com a droga-padrão DZP [$F(2,19)=4,1$; $p > 0,05$; $t(13)=-2,2$; $p < 0,05$].

No parâmetro tempo total de permanência no compartimento claro do modelo, representado na Figura 24B, a ANOVA de 1 via indicou que o tratamento por via oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* promoveu um aumento estatisticamente significativo, em ambas as doses testadas (100 e 300 mg/kg), quando comparadas ao controle, efeito similar ao observado com a droga-padrão ansiolítica DZP [$F(2,19)=9,18$; $p < 0,01$; $t(13)=-4,13$; $p < 0,01$].

Com relação aos parâmetros observados no teste do campo aberto e representados nas Figuras 25A e B, a ANOVA de 1 via não revelou qualquer alteração significativa referente aos tratamentos com o EA do pericarpo [número de levantamentos: $F(2,19)=2,61$; $p > 0,05$; número de áreas percorridas: $F(2,19)=1,39$; $p > 0,05$]. O tratamento com DZP alterou apenas o número de levantamentos, como pode ser observado na Figura 25A [número de levantamentos: $t(13)=2,93$; $p < 0,05$; número de áreas percorridas: $t(13)=0,53$; $p > 0,05$].

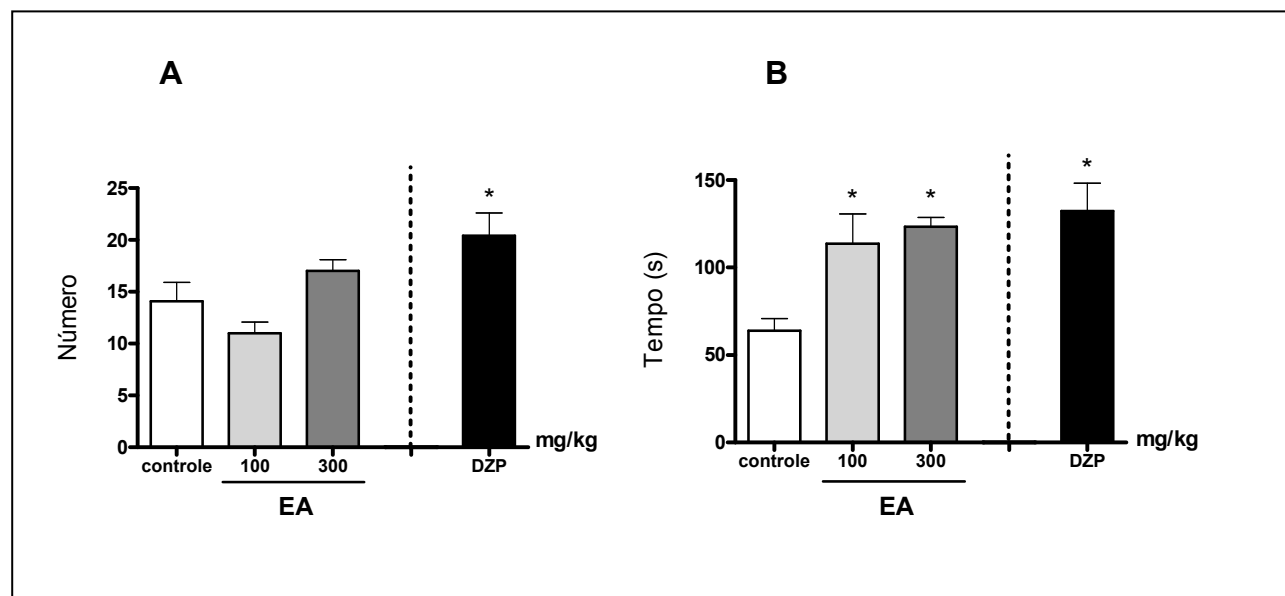


Figura 24 – Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* (100 e 300 mg/kg) no teste da transição claro-escuro. A) número de transições entre compartimentos. B) tempo total de permanência no compartimento claro. O diazepam (DZP), na dose de 2,5 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. N=7-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

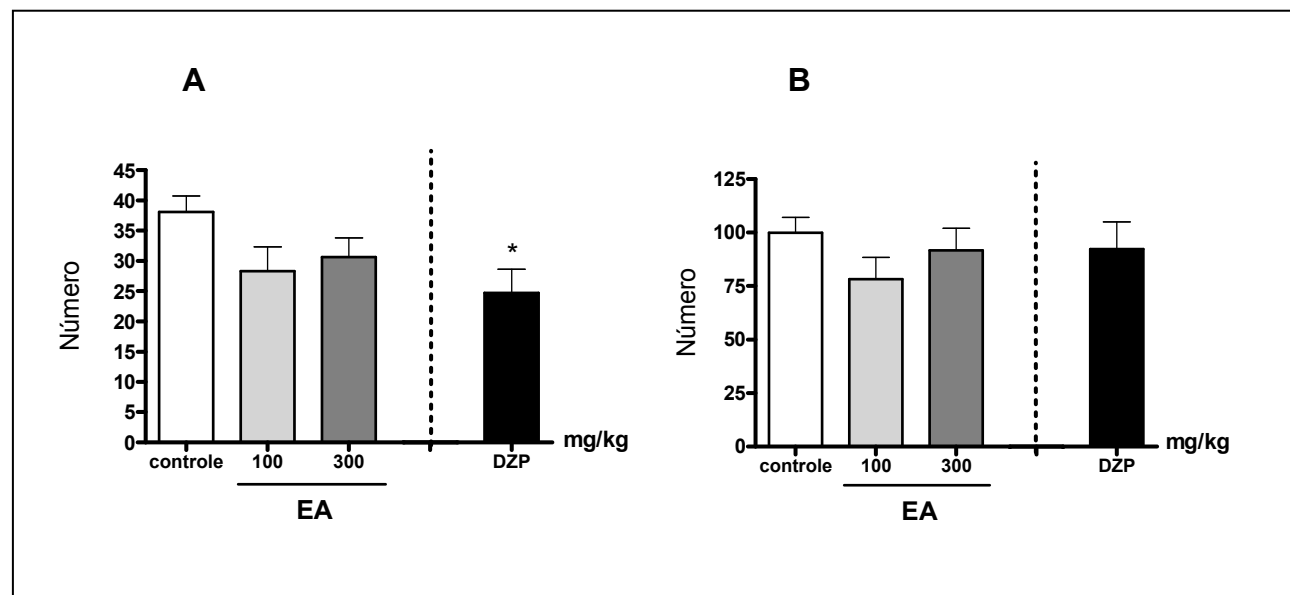


Figura 25 – Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* (100 e 300 mg/kg) no teste do campo aberto. A) número de levantamentos. B) número de áreas percorridas. O diazepam (DZP), na dose de 2,5 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. N=7-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. * $p < 0,05$ contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

4.3.4. Teste da suspensão pela cauda

No teste da suspensão pela cauda, a ANOVA de 1 via revelou diferença significativa entre os grupos tratados com as duas doses do EA do pericarpo de *P. edulis* (100 e 300 mg/kg), tanto no parâmetro latência para imobilidade quanto no tempo total de imobilidade, como pode ser observado nas Figuras 26A e B, respectivamente. As doses testadas induziram um aumento significativo na latência para início da imobilidade, de maneira similar ao que ocorreu com o tratamento com imipramina [$F(2,21)=7,55$; $p < 0,01$; $t(13)=-2,96$; $p < 0,05$], além de reduzir o tempo total de imobilidade, também de maneira semelhante à imipramina [$F(2,21)=19,43$; $p < 0,01$; $t(13)=7,51$; $p < 0,01$].

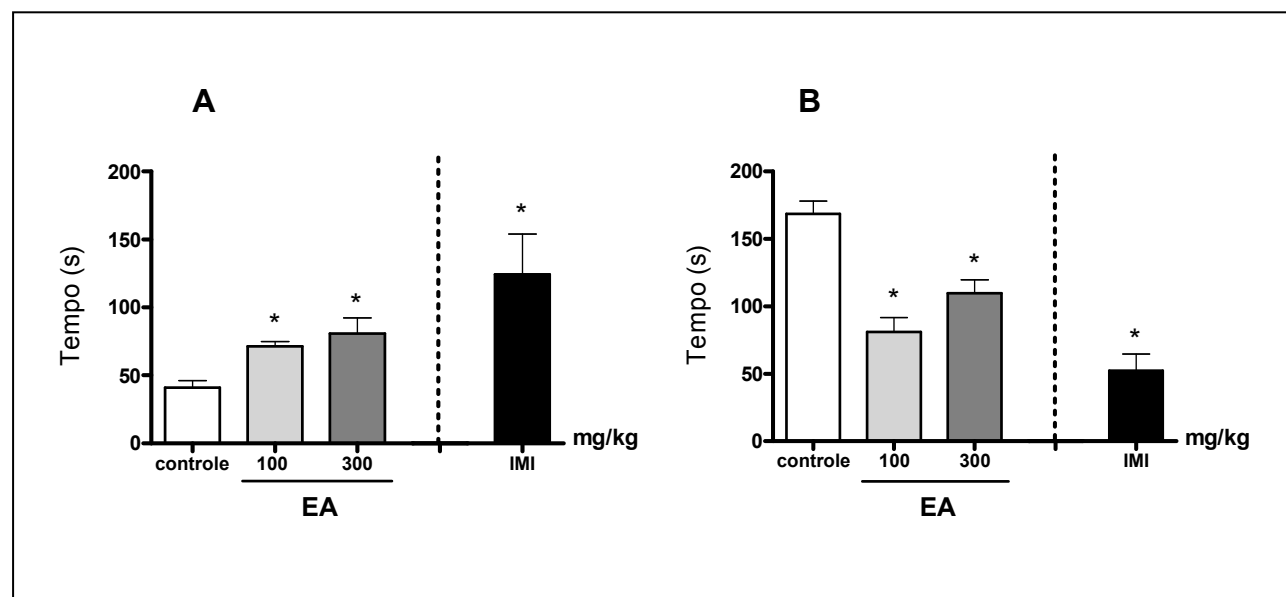


Figura 26 – Efeitos do tratamento oral com o EA do pericarpo de *P. edulis* (100 e 300 mg/kg) no teste da suspensão pela cauda. A) latência para início da imobilidade. B) tempo total de imobilidade. A imipramina (IMI), na dose de 45 mg/kg, v.o., foi utilizada como droga-padrão. N=7-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados da IMI).

4.4. Efeitos neurofarmacológicos das frações FB e FAR obtidas a partir do pericarpo de *P. edulis*

4.4.1. Teste da transição claro-escuro e do campo aberto

Com relação ao parâmetro número de transições entre compartimentos, observado no teste da transição claro-escuro, a ANOVA de 1 via indicou que a FB obtida a partir do EA do pericarpo de *P. edulis* produziu um aumento significativo em tal parâmetro, em todas as doses testadas (25, 50 e 100 mg/kg) e de maneira similar à droga-padrão DZP e quando comparados ao grupo controle [$F(3,27)=7,54$; $p < 0,01$; $t(13)=-4,84$; $p < 0,01$], como pode ser observado na Figura 27A. Já a FAR não produziu nenhum tipo de alteração neste parâmetro, como pode ser observado na Figura 27C [$F(3,26)=1,05$; $p > 0,05$; $t(12)=-1,6$; $p > 0,05$].

A análise estatística revelou, ainda, que todas as doses testadas da FB produziram aumento significativo do tempo total de permanência dos animais no lado claro do modelo quando comparado ao grupo controle, seguindo a mesma tendência apresentada pelo tratamento com o DZP [$F(3,27)=8,24$; $p < 0,01$; $t(13)=-5,5$; $p < 0,01$]. Este resultado pode ser observado na Figura 27B. Já com relação à FAR, nenhuma das doses testadas foi capaz de aumentar o tempo total de permanência no lado claro do modelo quando comparada ao grupo controle, o que pode ser observado pela análise da Figura 27D [$F(3,26)=2,59$; $p > 0,07$; $t(12)=-4,16$; $p < 0,01$].

Com relação aos parâmetros observados no teste do campo aberto, nenhum dos tratamentos produziu alterações significativas quando comparados ao grupo controle [FB= número de levantamentos: $F(3,26)=1,51$; $p > 0,05$; $t(12)=0,88$; $p > 0,05$; número de áreas percorridas: $F(3,26)=2,02$; $p > 0,05$; $t(12)=0,01$; $p > 0,05$; FAR= número de levantamentos: $F(3,26)=0,73$; $p > 0,05$; $t(12)=1,8$; $p > 0,05$; número de áreas percorridas: $F(3,26)=0,34$; $p > 0,05$; $t(12)=0,71$; $p > 0,05$], como pode ser observado nas Figuras 28A-D.

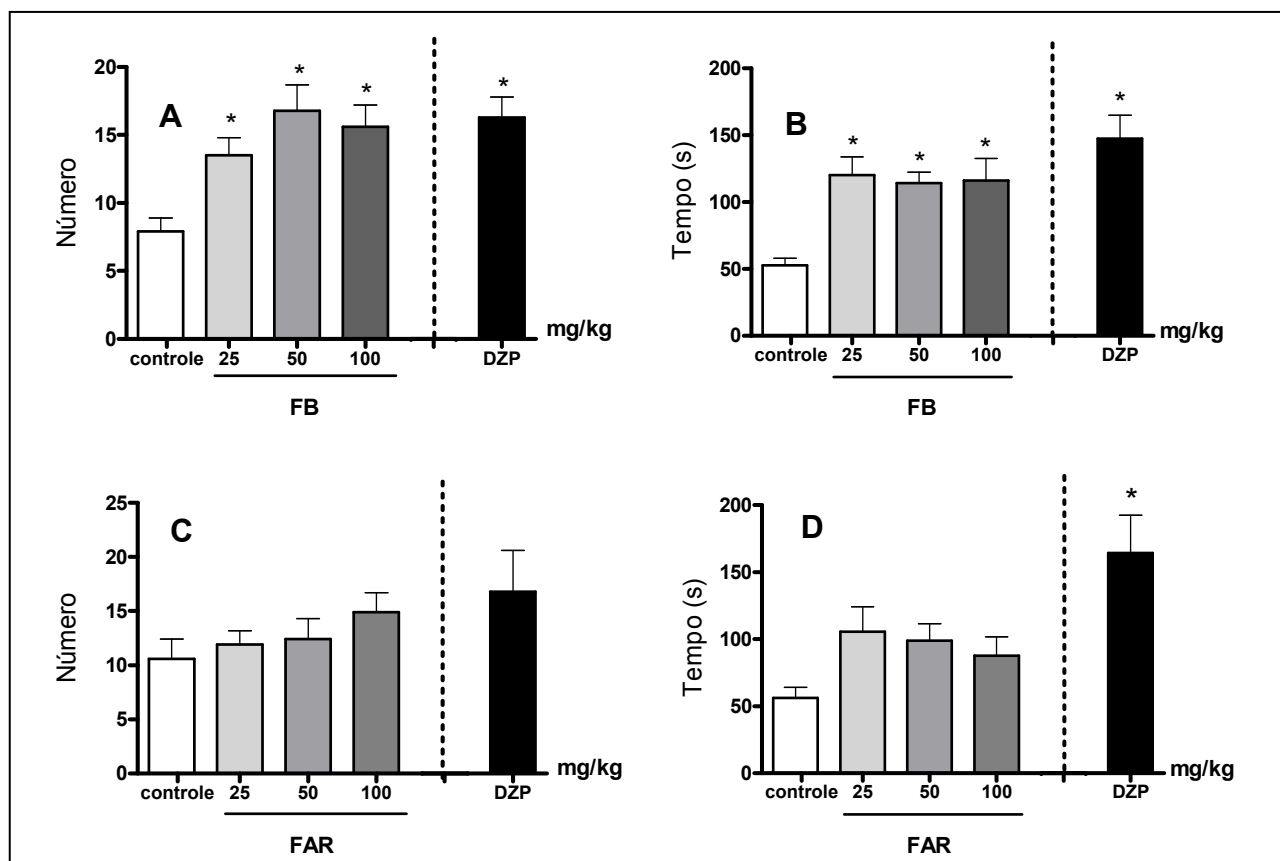


Figura 27 – Efeitos do tratamento oral com FB e FAR do pericarpo de *P. edulis* (25, 50 e 100 mg/kg) no teste da transição claro-escuro. A) efeito da FB no número de transições entre compartimentos. B) efeito da FB no tempo total de permanência no compartimento claro. C) efeito da FAR no número de transições entre compartimentos. D) efeito da FAR no tempo total de permanência no compartimento claro. O diazepam (DZP), na dose de 2,5 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. N=6-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

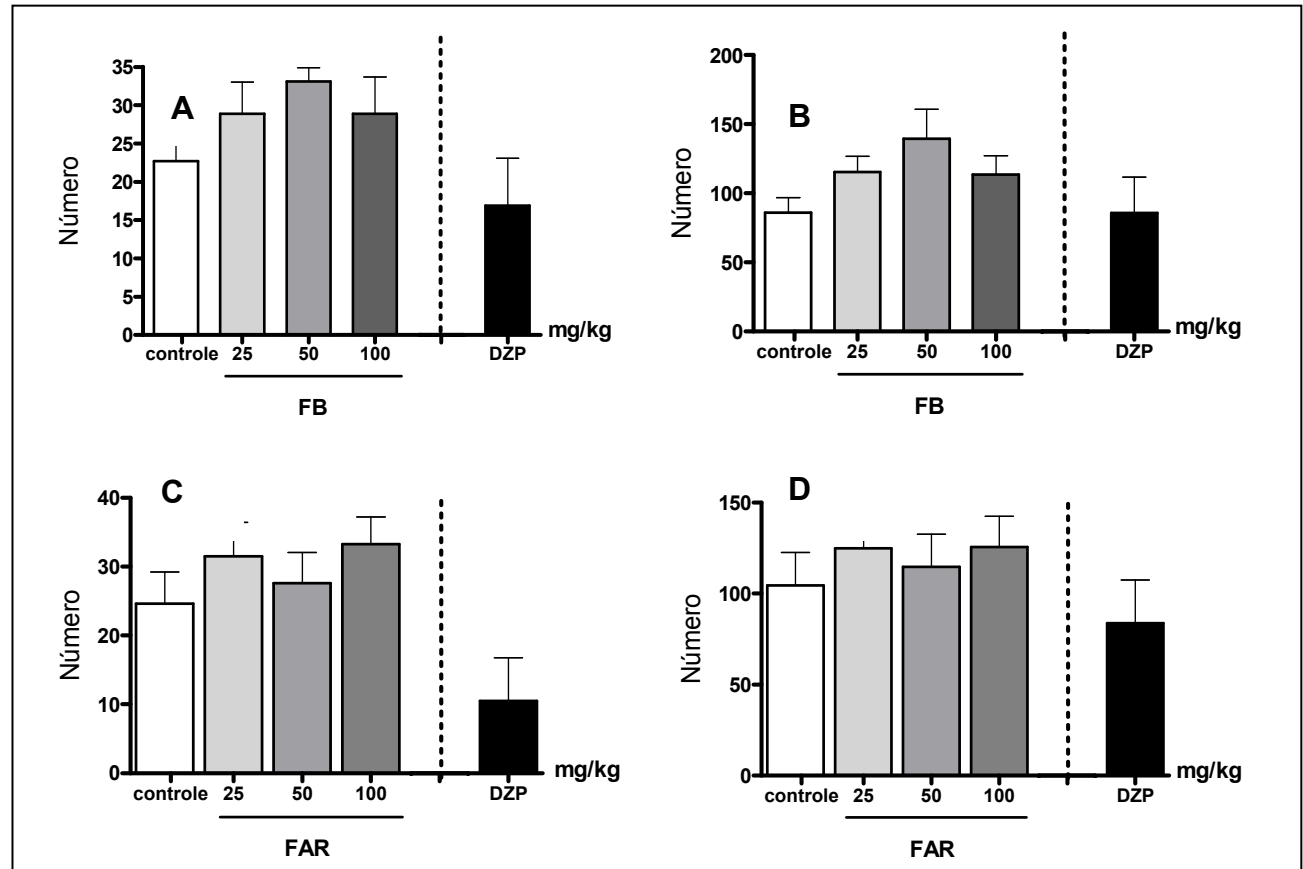


Figura 28 – Efeitos do tratamento oral com FB e FAR do pericarpo de *P. edulis* (25, 50 e 100 mg/kg) no teste do campo aberto. A) efeito da FB no número de levantamentos. B) efeito da FB no número de áreas percorridas. C) efeito da FAR no número de levantamentos. D) efeito da FAR no número de áreas percorridas. O diazepam (DZP), na dose de 2,5 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. N=6-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m.

4.4.2. Teste da suspensão pela cauda

A ANOVA de 1 via indicou que o tratamento com a FB do pericarpo de *P. edulis* produziu um aumento significativo na latência para início da imobilidade nas doses de 25 e 100 mg/kg, quando comparadas ao grupo controle, embora a dose de 50 mg/kg tenha apresentado apenas uma tendência ao aumento [$F(3,37)=5,88$; $p < 0,01$; $t(18)=-4,94$; $p < 0,05$]. Também houve diminuição significativa do tempo total de imobilidade promovida pelas três doses testadas de FB, quando comparadas ao grupo controle, de maneira semelhante ao efeito causado pela imipramina [$F(3,37)=17,89$; $p < 0,01$; $t(18)=6,46$; $p < 0,01$]. Os dados referentes aos efeitos da FB no teste da suspensão pela cauda estão representados nas Figuras 29A e B.

Com relação aos efeitos produzidos pelo tratamento com a FAR, a ANOVA de 1 via indicou ausência de efeitos em todas as doses testadas em ambos os parâmetros analisados, quando comparadas ao grupo controle, ao contrário do que foi observado no tratamento com a droga-padrão imipramina [latência para imobilidade: $F(3,27)=1,48$; $p > 0,05$; $t(14)=-2,4$; $p < 0,05$; tempo total de imobilidade: $F(3,27)=0,75$; $p > 0,05$; $t(14)=2,93$; $p < 0,05$], como pode ser observado nas Figuras 29C e D.

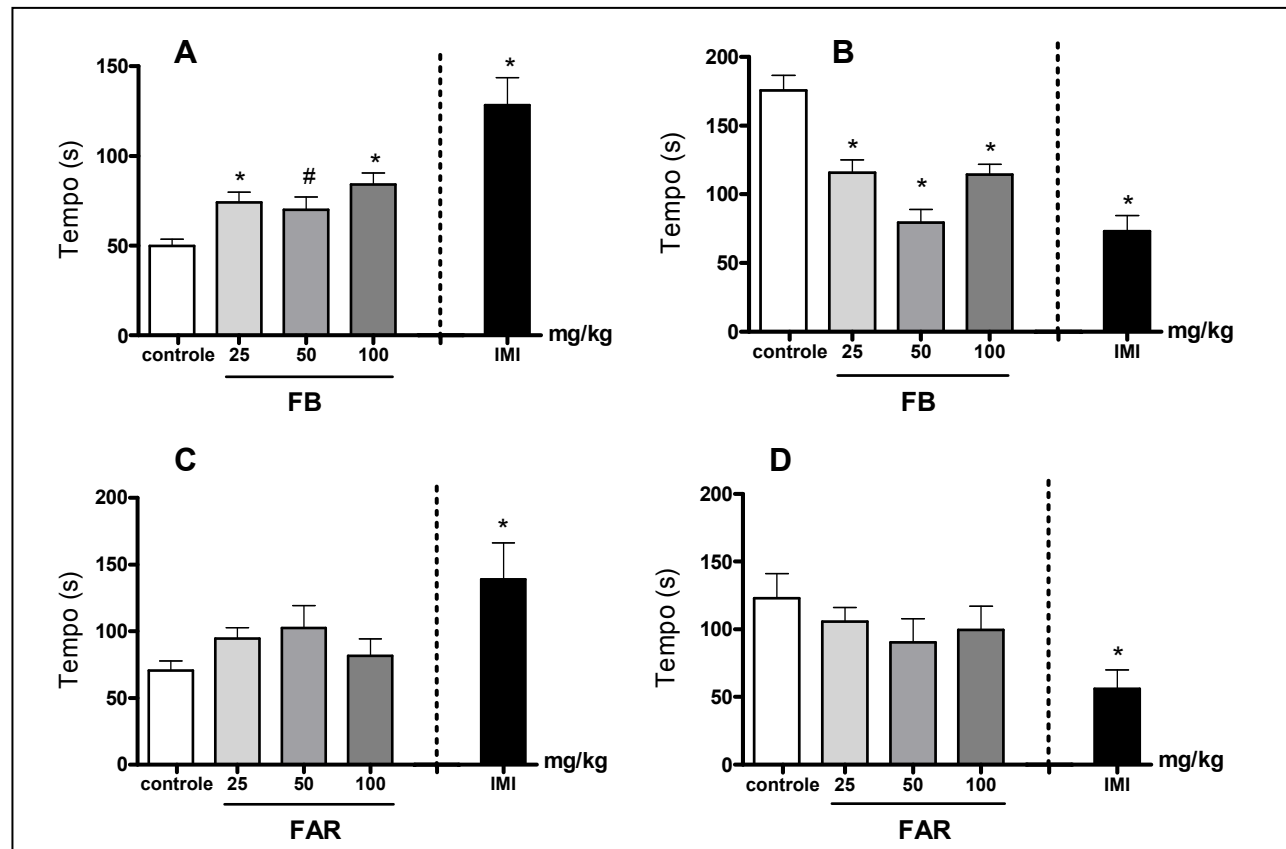


Figura 29 – Efeitos do tratamento oral com FB e FAR do pericarpo de *P. edulis* (25, 50 e 100 mg/kg) no teste da suspensão pela cauda. A) efeito da FB na latência para a primeira imobilidade. B) efeito da FB no tempo total de imobilidade. C) efeito da FAR na latência para a primeira imobilidade. D) efeito da FAR no tempo total de imobilidade. A imipramina (IMI), na dose de 45 mg/kg, v.o., foi utilizada como droga-padrão. N=7-11 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. *p < 0,05 contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados da IMI).

4.5. Efeitos neurofarmacológicos da isoorientina e da fração de flavonóides sem a isoorientina (FF) obtidas a partir do pericarpo de *P. edulis*

4.5.1. Teste da transição claro-escuro e do campo aberto

A ANOVA de 1 via indicou ausência de efeitos no parâmetro número de transições entre os compartimentos tanto no tratamento com a isoorientina, quanto com a FF, quando comparadas aos valores dos controles, em todas as doses testadas (0,5, 1, 5 e 10 mg/kg) [isoorientina: $F(4,33)=2,13$; $p > 0,05$; $t(13)=-3,22$; $p < 0,01$; FF: $F(4,35)=1,96$; $p > 0,05$; $t(14)=-3,82$; $p < 0,01$], como pode ser observado na Figura 30A e C.

Como pode ser observado na Figura 30B, com relação ao segundo parâmetro observado no teste, a análise estatística indicou que o tratamento com a isoorientina aumentou significativamente o tempo que os animais permaneceram no lado claro do modelo na dose de 10 mg/kg, enquanto que as doses de 0,5 e 5 mg/kg apresentaram apenas uma tendência a aumentar este parâmetro ($p = 0,07$ em ambos os casos), quando comparadas ao grupo controle. Aumento similar no tempo de permanência foi observado para o tratamento com o DZP [$F(4,33)=2,68$; $p < 0,05$; $t(13)=-3,83$; $p < 0,01$]. Já o tratamento com FF, como mostrado na Figura 30D, não produziu nenhuma alteração estatisticamente significativa em nenhuma das doses testadas, quando comparadas ao grupo controle, ao contrário do que foi observado no tratamento com o DZP [$F(4,35)=1,38$; $p > 0,05$; $t(14)=-4,67$; $p < 0,01$].

Com relação aos parâmetros observados no teste do campo aberto (número de levantamentos e de cruzamentos), ambos os tratamentos não produziram nenhuma alteração estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle, como pode ser observado nas Figuras 31A-D [isoorientina= número de levantamentos: $F(4,33)=1,72$; $p > 0,05$; $t(13)=5,6$; $p < 0,01$; número de áreas percorridas: $F(4,33)=1,09$; $p > 0,05$; $t(13)=1,49$; $p > 0,05$; FF= número de levantamentos: $F(4,35)=0,27$; $p > 0,05$; $t(14)=3,19$; $p < 0,01$; número de áreas percorridas: $F(4,35)=0,3$; $p > 0,05$; $t(14)=1,18$; $p > 0,05$].

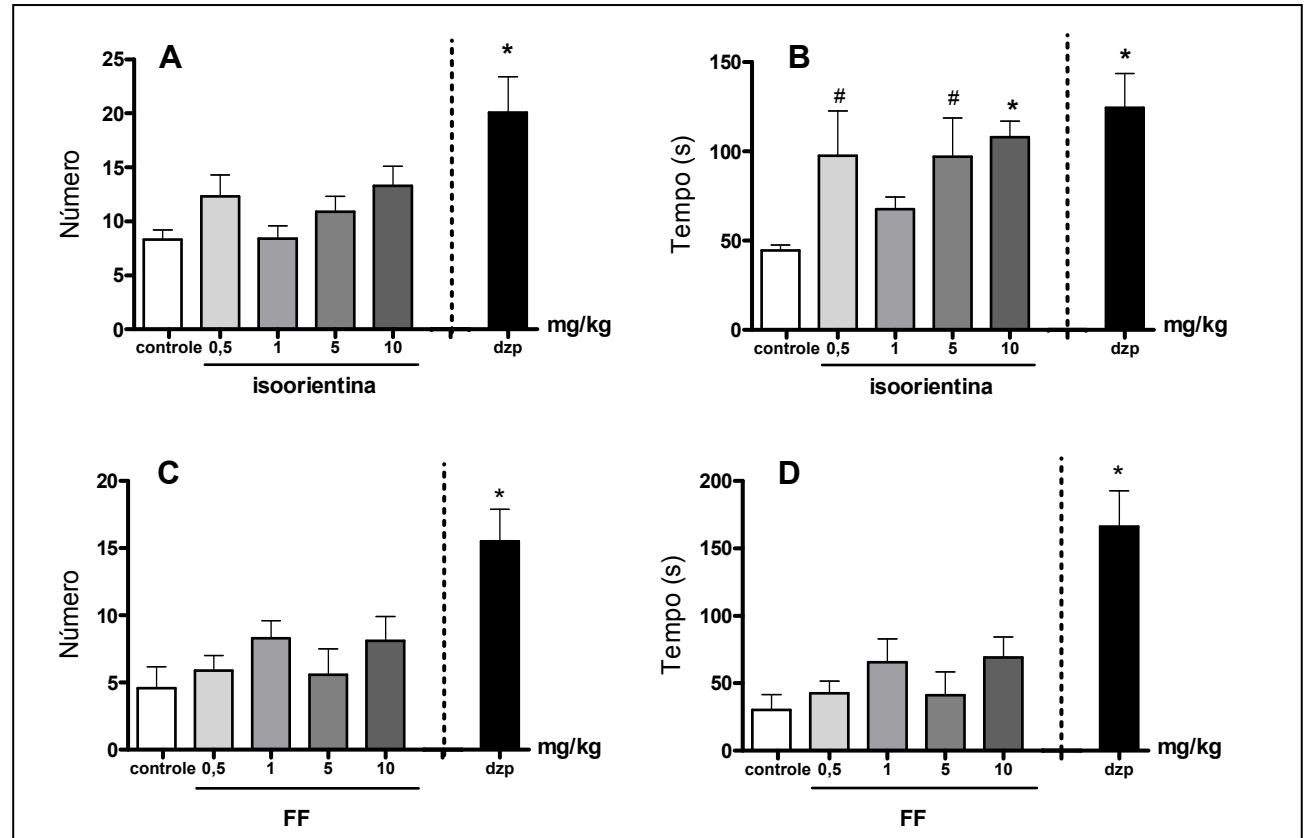


Figura 30 – Efeitos do tratamento oral com isoorientina e FF obtidas a partir do pericarpo de *P. edulis* (0,5, 1, 5 e 10 mg/kg) no teste da transição claro-escuro. A) efeito da isoorientina no número de transições entre compartimentos. B) efeito da isoorientina no tempo total de permanência no compartimento claro. C) efeito da FF no número de transições entre compartimentos. D) efeito da FF no tempo total de permanência no compartimento claro. O diazepam (DZP), na dose de 2 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. N=7-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. *p < 0,05 contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

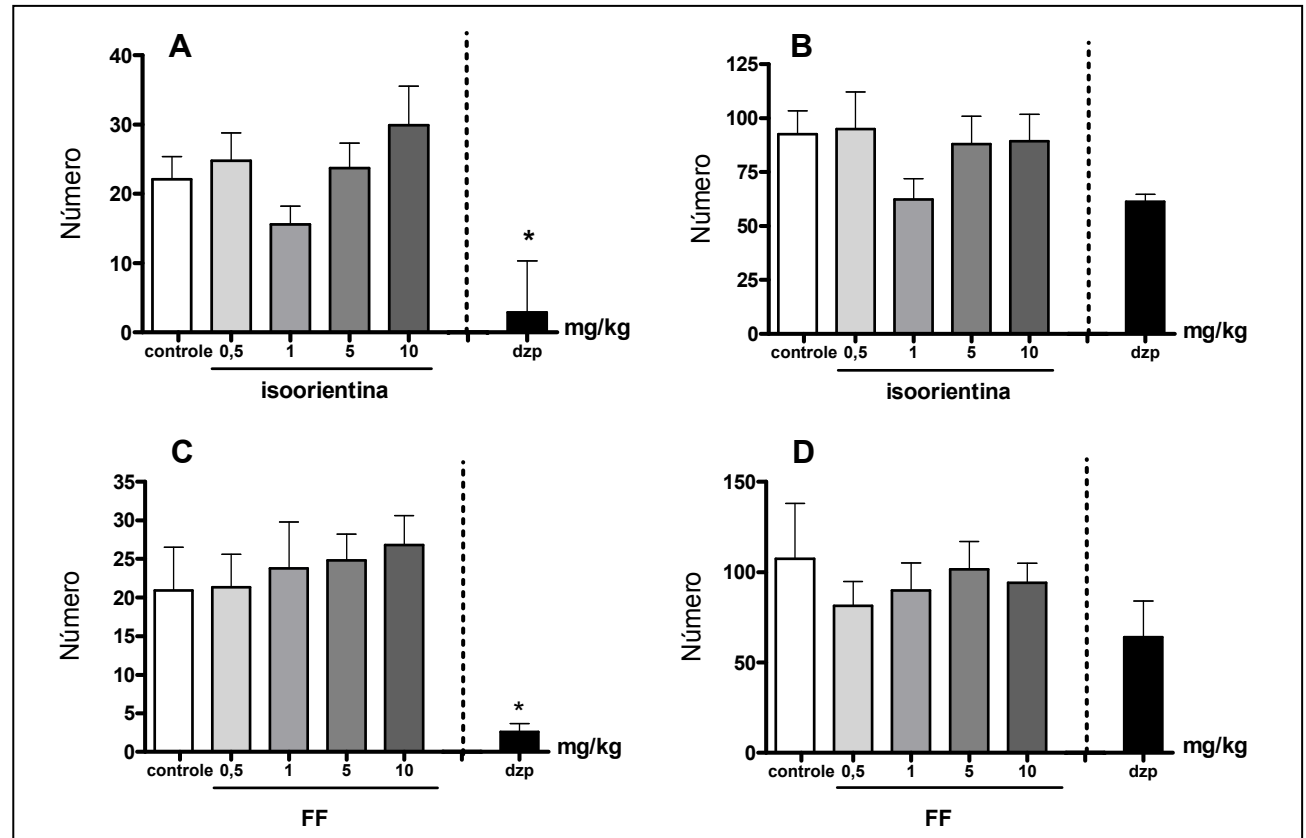


Figura 31 – Efeitos do tratamento oral com isoorientina e FF obtidas a partir do pericarpo de *P. edulis* (0,5, 1, 5 e 10 mg/kg) no teste do campo aberto. A) efeito da isoorientina no número de levantamentos. B) efeito da isoorientina no número de áreas percorridas. C) efeito da FF no número de levantamentos. D) efeito da FF no número de áreas percorridas. O diazepam (DZP), na dose de 2 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. N=7-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média ± e.p.m. *p < 0,05 contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados do DZP).

4.5.2. Teste da suspensão pela cauda

A análise estatística revelou que o tratamento por via oral com a isoorientina isolada a partir do pericarpo de *P. edulis* aumentou significativamente, em todas as doses testadas (0,5, 1, 5 e 10 mg/kg), o tempo de latência para o início da imobilidade, quando comparadas ao grupo controle e de maneira similar à droga-padrão imipramina, como pode ser observado na Figura 32A [$F(4,37)=12,03$; $p < 0,01$; $t(18)=-6,02$; $p < 0,01$]. Com relação ao parâmetro tempo total de imobilidade, o tratamento com isoorientina diminuiu significativamente o tempo, quando comparado ao grupo controle, nas doses de 1 e 5 mg/kg, de maneira semelhante ao tratamento com imipramina, como pode ser observado na Figura 32B. A maior dose, 10 mg/kg, não produziu efeitos significativos [$F(4,37)=8,14$; $p < 0,01$; $t(18)=6,3$; $p < 0,01$].

O tratamento com FF, por sua vez, não produziu efeitos estatisticamente significativos em nenhum dos parâmetros avaliados no teste da suspensão pela cauda em nenhuma das doses testadas (0,5, 1, 5 e 10 mg/kg), quando comparadas ao grupo controle, contrariamente ao observado no tratamento com a imipramina [latência para imobilidade: $F(4,37)=0,6$; $p > 0,05$; $t(18)=-2,97$; $p < 0,01$; tempo total de imobilidade: $F(4,37)=0,68$; $p > 0,05$; $t(18)=3,98$; $p < 0,01$]. Os efeitos do tratamento com FF no teste da suspensão pela cauda podem ser observados nas Figuras 32C e D.

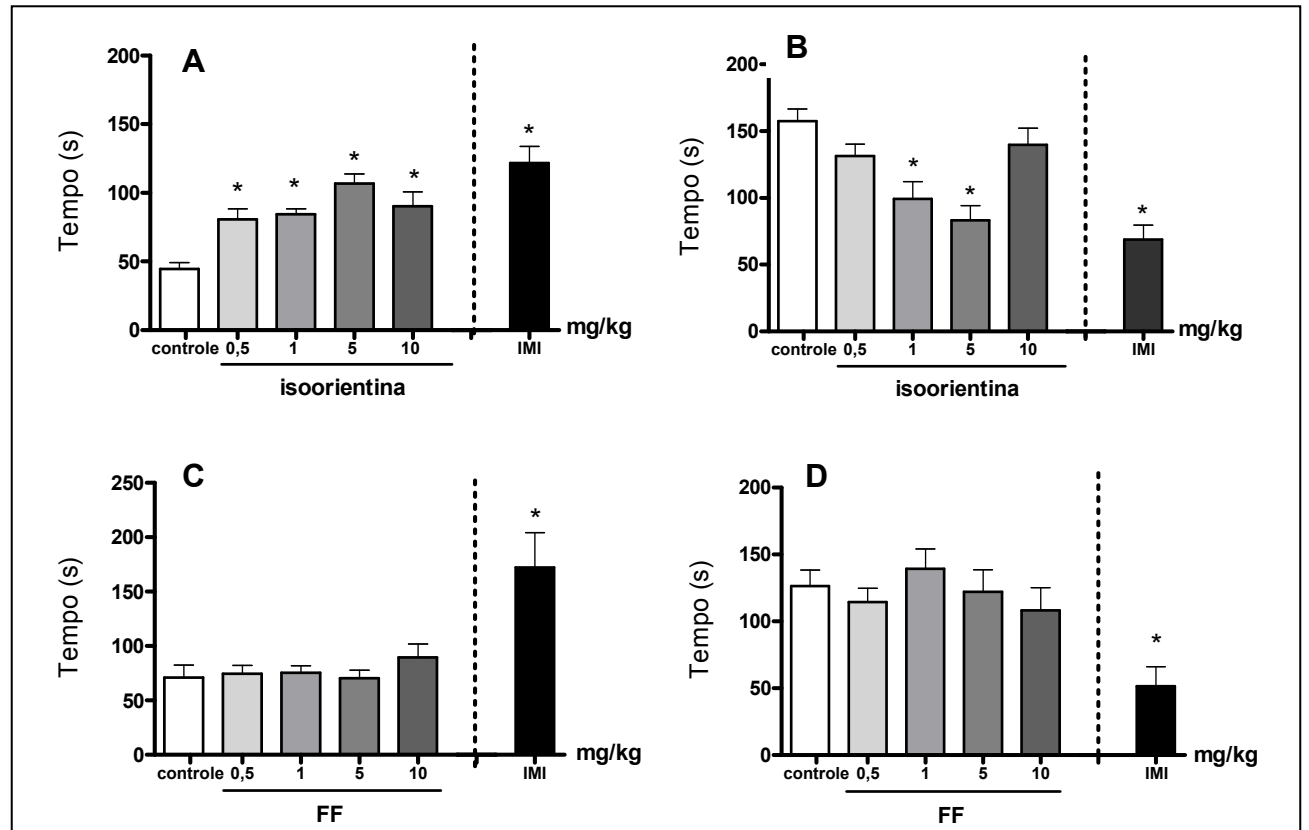


Figura 32 – Efeitos do tratamento oral com isoorientina e FF obtidas a partir do pericarpo de *P. edulis* (0,5, 1, 5 e 10 mg/kg) no teste da suspensão pela cauda. A) efeito da isoorientina na latência para a primeira imobilidade. B) efeito da isoorientina no tempo total de imobilidade. C) efeito da FF na latência para a primeira imobilidade. D) efeito da FF no tempo total de imobilidade. A imipramina (IMI), na dose de 45 mg/kg, v.o., foi utilizada como droga-padrão. N=8-10 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ contra o grupo controle (ANOVA seguida por teste de Dunnett; teste t de Student não pareado foi utilizado para os dados da IMI).

4.6. Investigação dos possíveis mecanismos de ação neurofarmacológica da isoorientina obtida a partir do pericarpo de *P. edulis*

4.6.1. Envolvimento do sistema GABA-benzodiazepínico no efeito tipo-ansiolítico da isoorientina no teste da transição claro-escuro e do campo aberto

Como pode ser observado na Figura 33A, a ANOVA de 2 vias não apontou qualquer diferença significativa entre os grupos no parâmetro número de transições entre compartimentos no teste da transição claro-escuro [$F(5,42)=0,84$; $p > 0,05$]. Já no parâmetro tempo total de permanência no compartimento claro, a ANOVA de 2 vias indicou diferença estatística com relação aos fatores tratamento [$F(5,42)=24,42$; $p < 0,01$], pré-tratamento [$F(5,42)=7,5$; $p < 0,01$] e da interação entre os fatores [$F(5,42)=6,8$; $p < 0,01$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls evidenciou que o tratamento com a isoorientina, da mesma forma que com DZP, aumentou significativamente o tempo de permanência dos animais no lado claro do modelo, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, o pré-tratamento com FMZ bloqueou significativamente o efeito do DZP, mas não o da isoorientina, como pode ser observado na Figura 33B. Com relação aos parâmetros observados no teste do campo aberto (número de levantamentos e de áreas percorridas), e que podem ser observados nas Figuras 33C e D, a ANOVA de 2 vias revelou ausência de efeitos de qualquer tratamento ou pré-tratamento em ambos os parâmetros.

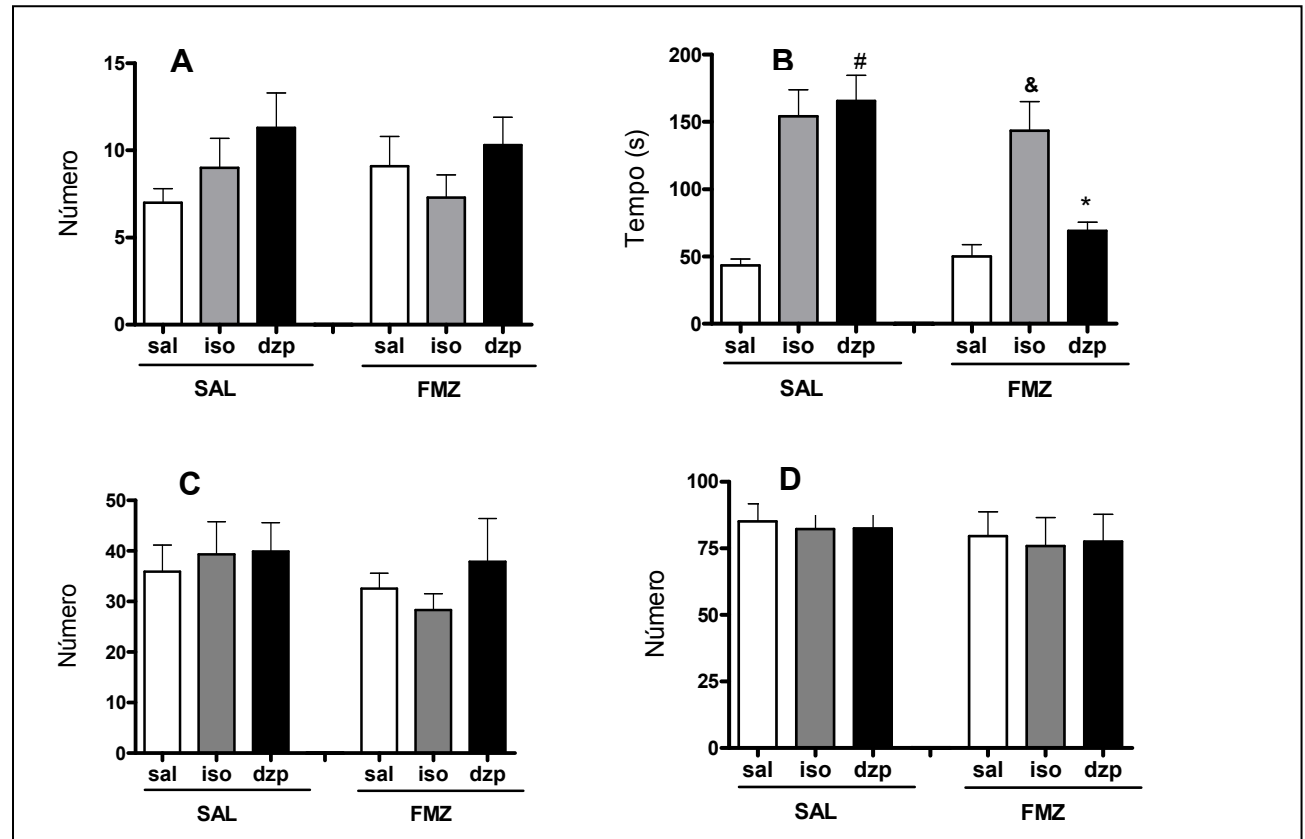


Figura 33 – Efeitos do pré-tratamento com flumazenil (FMZ, 1 mg/kg, i.p.) 15 min antes do tratamento oral com isoorientina (10 mg/kg) nos testes da transição claro-escuro e do campo aberto. A) número de transições entre os compartimentos. B) tempo total de permanência no compartimento claro. C) número de levantamentos no campo aberto. D) número de áreas percorridas no campo aberto. Diazepam (DZP) 2 mg/kg, v.o., foi utilizado como droga-padrão. N=8 animais/grupo. Dados representados como média \pm e.p.m. [#]p < 0,01 com relação ao grupo controle no pré-tratamento com salina; [&]p < 0,01 com relação ao grupo controle no pré-tratamento com flumazenil; ^{*}p < 0,01 contra o mesmo grupo no pré-tratamento com salina (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Student Newman-Keuls).

4.6.2. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-ansiolítico da isoorientina no teste da transição claro-escuro e do campo aberto

A ANOVA de 2 vias indicou efeito significativo da interação entre o tratamento e o pré-tratamento no parâmetro número de transições entre compartimentos no teste da transição claro-escuro [$F(5,41)=3,95$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou apenas uma tendência ($p = 0,07$) à diminuição do número de transições causada pelo tratamento com isoorientina, quando comparada ao grupo controle, em presença do pré-tratamento com WAY-100635, como pode ser observado na Figura 34A. Com relação ao parâmetro tempo total de permanência no compartimento claro, a ANOVA de 2 vias indicou efeito significativo do tratamento [$F(5,41)=21,12$; $p < 0,01$], do pré-tratamento [$F(5,41)=48,35$; $p < 0,01$] e da interação entre os fatores [$F(5,41)=18,09$; $p < 0,01$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento com isoorientina assim como com buspirona aumentaram significativamente o tempo de permanência dos animais no compartimento claro da caixa claro-escuro, quando comparados ao grupo controle. Além disso, a análise estatística indicou que esse efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com WAY-100635 em ambos os tratamentos, como pode ser observado na Figura 34B. Com relação ao parâmetro número de levantamentos, observado no teste do campo aberto, embora a ANOVA de 2 vias tenha indicado um efeito do tratamento [$F(5,41)=3,43$; $p < 0,05$], o teste *post hoc* de Newman-Keuls não indicou nenhuma diferença estatística entre os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos também no parâmetro número de áreas percorridas. Os resultados obtidos no teste do campo aberto estão representados nas Figuras 34C e D.

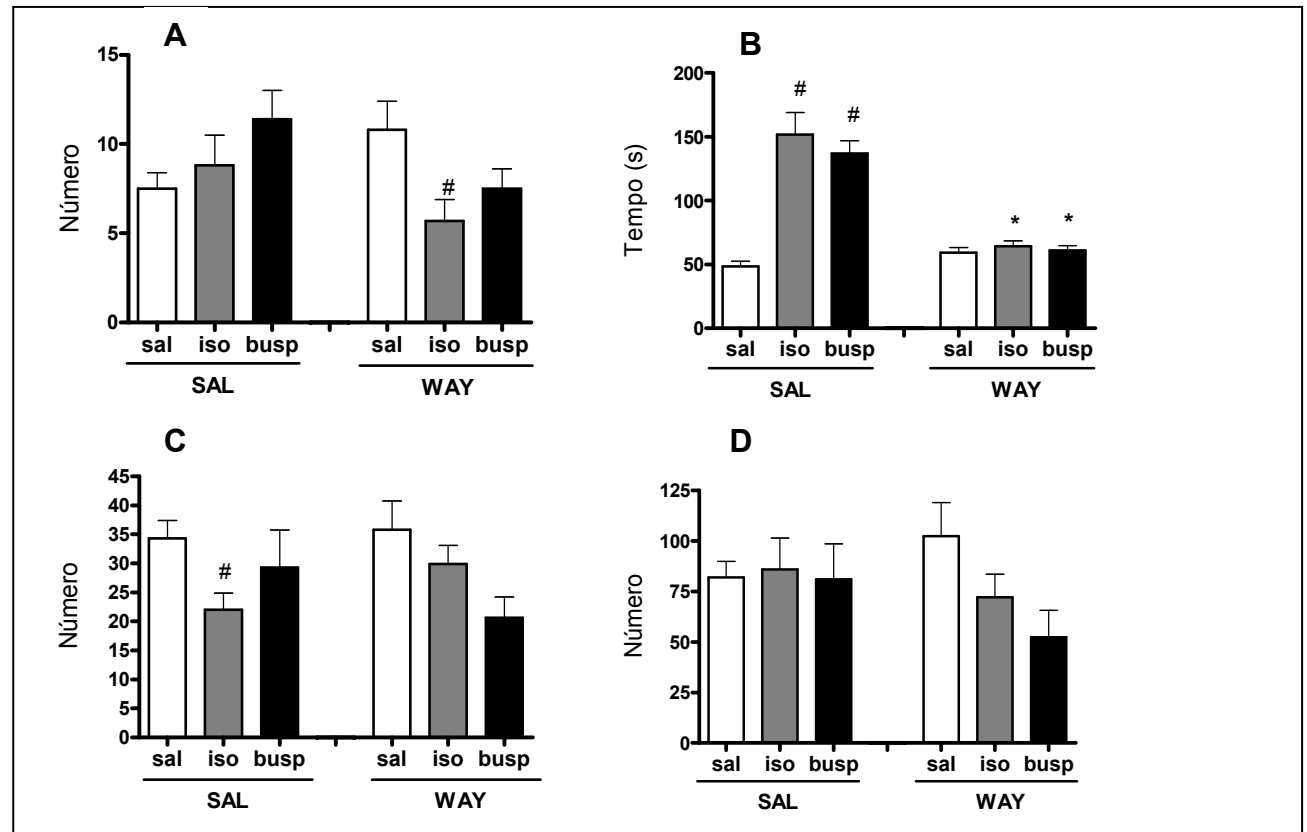


Figura 34 – Efeitos do pré-tratamento com WAY-100635 (WAY, 0,5 mg/kg, i.p.) 15 min antes do tratamento oral com isoorientina (10 mg/kg) nos testes da transição claro-escuro e do campo aberto. A) número de transições entre os compartimentos. B) tempo total de permanência no compartimento claro. C) número de levantamentos no campo aberto. D) número de áreas percorridas no campo aberto. Buspirona (busp) 10 mg/kg, v.o., foi utilizada como droga-padrão. N=7-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. [#]p = 0,07 com relação ao grupo controle no pré-tratamento com salina (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Student Newman-Keuls).

4.6.3. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo da isoorientina no teste da suspensão pela cauda

No parâmetro latência para início da imobilidade, observado no teste da suspensão pela cauda, a ANOVA de 2 vias indicou diferença significativa nos fatores tratamento [$F(5,39)=14,03$; $p < 0,01$], pré-tratamento [$F(5,39)=16,89$; $p < 0,01$] e na interação entre os fatores [$F(5,39)=5,7$; $p < 0,01$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que os tratamentos com isoorientina ou com imipramina aumentaram significativamente o tempo de latência para a primeira imobilidade, quando comparados ao grupo controle, como pode ser observado na Figura 35A. O pré-tratamento com PCPA bloqueou esse efeito, reduzindo significativamente o tempo de latência quando comparado ao pré-tratamento com salina.

No segundo parâmetro observado, tempo total de imobilidade, a ANOVA de 2 vias também apontou diferença significativa nos fatores tratamento [$F(5,39)=22,11$; $p < 0,01$], pré-tratamento [$F(5,39)=12,88$; $p < 0,01$] e na interação entre os fatores [$F(5,39)=9,53$; $p < 0,01$]. Neste parâmetro, o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento com isoorientina ou com imipramina reduziram significativamente o tempo total de imobilidade dos animais, quando pré-tratados com salina, mas que o pré-tratamento com PCPA bloqueou esse efeito, uma vez que aumentou significativamente o tempo de imobilidade quando comparado com o pré-tratamento com salina. Esses efeitos estão apresentados na Figura 35B.

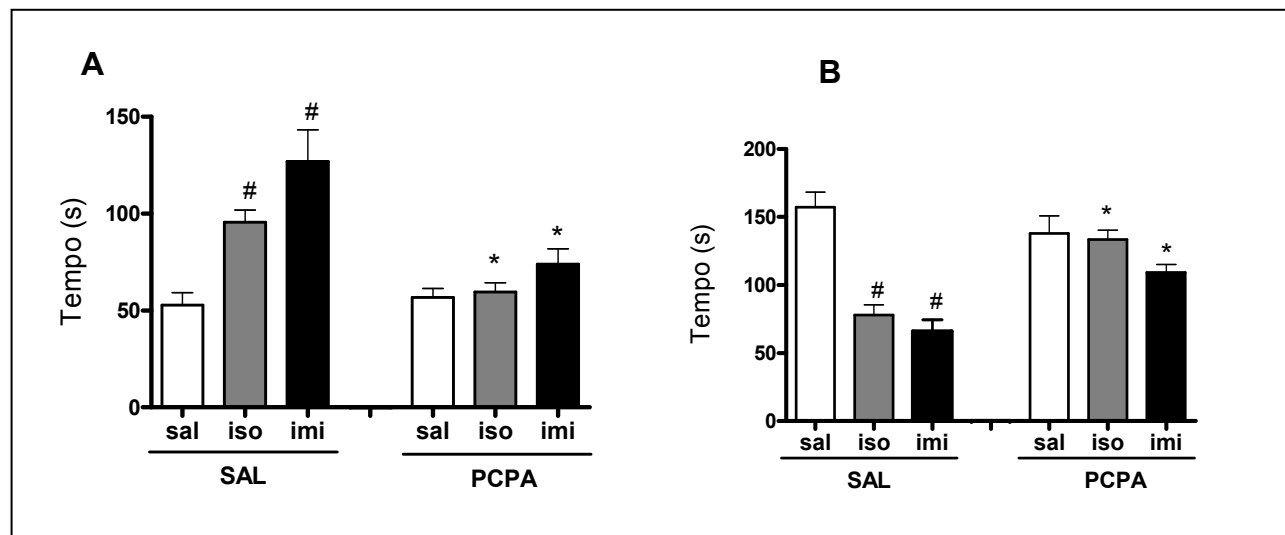


Figura 35 – Efeitos do pré-tratamento com *p*-clorofenilalanina (PCPA, 100 mg/kg, 4 dias) nos efeitos do tratamento oral com isoorientina (5 mg/kg) isolada a partir do pericarpo de *P. edulis* no teste da suspensão pela cauda. A) latência para a primeira imobilidade. B) tempo total imobilidade. A imipramina (imi) na dose de 45 mg/kg, v.o., foi utilizada como droga-padrão. N=6-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. [#]p < 0,01 com relação ao grupo controle no pré-tratamento com salina; ^{*}p < 0,01 com relação ao mesmo grupo no pré-tratamento com salina (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Student Newman-Keuls).

4.6.4. Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo da isoorientina no teste da suspensão pela cauda

A ANOVA de 2 vias indicou, no parâmetro latência para início da imobilidade, diferença significativa nos fatores pré-tratamento [$F(5,41)=21,76$; $p < 0,01$], tratamento [$F(5,41)=32,34$; $p < 0,01$] e na interação entre os fatores [$F(5,41)=13,05$; $p < 0,01$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls apontou que o tratamento com isoorientina ou com imipramina aumentaram significativamente a latência para a primeira imobilidade, quando comparados ao grupo controle, como pode ser observado na Figura 36A. O pré-tratamento com prazosina bloqueou apenas o efeito promovido pelo tratamento com a imipramina, reduzindo significativamente o tempo de latência quando comparado ao pré-tratamento com salina. Não houve efeito significativo do pré-tratamento com prazosina sobre o efeito observado no tratamento com isoorientina, que se manteve significativamente diferente quando comparado com o tratamento com salina.

No parâmetro tempo total de imobilidade, a ANOVA de 2 vias também apontou diferença significativa nos fatores tratamento [$F(5,41)=34,5$; $p < 0,01$], pré-tratamento [$F(5,41)=5,9$; $p < 0,05$] e na interação entre os fatores [$F(5,41)=10,3$; $p < 0,01$]. Neste parâmetro, o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento com isoorientina ou com imipramina reduziram significativamente o tempo total de imobilidade dos animais, quando pré-tratados com salina. O pré-tratamento com prazosina bloqueou apenas o efeito da imipramina, não alterando o efeito observado da isoorientina, como pode ser observado na Figura 36B.

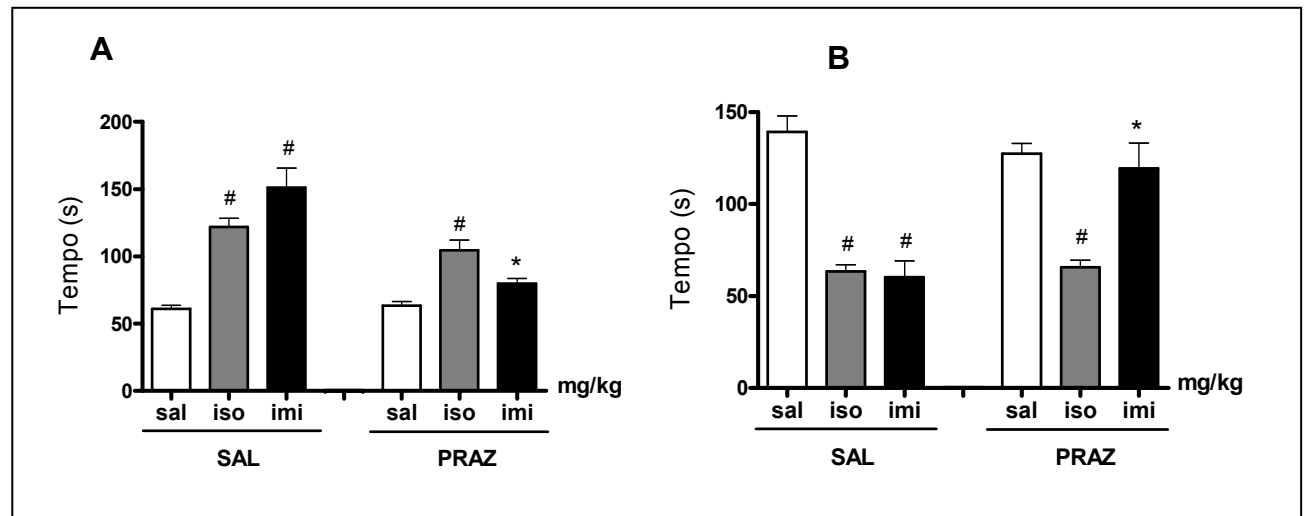


Figura 36 – Efeitos do pré-tratamento com prazosina (PRAZ, 1 mg/kg) 30 min antes do tratamento oral com isoorientina (5 mg/kg) isolada a partir do pericarpo de *P. edulis* no teste da suspensão pela cauda. A) latência para a primeira imobilidade. B) tempo total imobilidade. A imipramina (imi) na dose de 45 mg/kg, v.o., foi utilizada como droga-padrão. N=7-8 animais/grupo. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. # $p < 0,01$ com relação ao grupo controle no mesmo pré-tratamento; * $p < 0,01$ com relação ao mesmo grupo entre os diferentes pré-tratamentos (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Student Newman-Keuls).



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As plantas continuam a representar uma extraordinária fonte de diversidade natural de compostos bioativos, os quais têm se mostrado muito úteis como agentes terapêuticos para o tratamento de uma grande variedade de doenças humanas e, principalmente, mostram-se passíveis de síntese química (GURIB-FAKIM, 2006; HARVEY, 2008; KOLEWE et al., 2008; LI E VEDERAS, 2009; NICOLAOU et al., 2009). Durante muitos séculos, as plantas representaram a principal, por vezes única, fonte de tratamento, alívio ou cura das doenças humanas (GURIB-FAKIM, 2006; SAKLANI E KUTTY, 2008). Embora hoje já possamos contar com uma ampla gama de medicamentos industrializados, ainda assim bilhões de pessoas em todo o mundo utilizam plantas para o tratamento de problemas de saúde, haja vista o grande número de prescrições médicas que indicam formulações baseadas em plantas ou em substâncias derivadas de plantas que ainda são realizadas nos dias de hoje (FARNSWORTH E SOEJARTO, 1991; PEI, 2001; SCHUSTER, 2001; GURIB-FAKIM, 2006; HARVEY, 2008).

Dentre as plantas tradicionalmente utilizadas, as espécies detentoras de propriedades psicoativas talvez sejam aquelas que vêm acompanhando o homem em sua história há mais tempo, em função da descoberta dos efeitos que podem produzir sobre a mente humana (CLEMENT et al., 2004; ZHANG, 2004; PRISINZANO, 2009). Historicamente, as plantas medicinais psicoativas têm sido utilizadas por seu valor medicinal e/ou em função da capacidade de produzir estados alterados de consciência. Muito do que a ciência moderna conhece hoje sobre os mecanismos neuroquímicos cerebrais e do funcionamento do sistema nervoso central possui relação direta com o estudo dos produtos naturais psicoativos. Exemplos muito importantes podem ser citados. O estudo da química e da farmacologia da morfina, por exemplo, um alcaloide isolado a partir da *Papaver somniferum*, levou à identificação dos receptores opioides e, conseqüentemente, do sistema de opiáceos endógenos, esclarecendo muitos aspectos da nocicepção, entre outros processos fisiológicos (CALIXTO et al., 2000; WALDHOER et al., 2004; LI E VEDERAS, 2009). Da mesma forma, os estudos sobre os efeitos biológicos do Δ_9 -tetrahydrocannabinol e de outros canabinoides, componentes ativos da maconha (*Cannabis* sp), levaram à identificação dos receptores canabinoides e do sistema canabinoide e sua participação

em diversas funções fisiopatológicas (DI MARZO, 2008). Estudos sobre os alcaloides da *Rauwolfia serpentina*, entre eles a reserpina, expandiu muito a compreensão acerca da neurotransmissão serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica existente à época e, conseqüentemente, lançou luz ao conhecimento das bases neurobiológicas dos transtornos depressivos e da pressão arterial (SLATTERY et al., 2004).

Dentre as plantas medicinais utilizadas em função de suas propriedades psicoativas, as espécies do gênero *Passiflora*, popularmente conhecidas como maracujá, ocupam um papel de destaque tanto em função de seu amplo uso pela população, quanto por serem objetos de estudo de um grande número de trabalhos disponíveis na literatura, entre os quais se inclui o presente trabalho. Como já foi mencionado na Introdução desta tese, das investigações neurofarmacológicas encontradas na literatura sobre espécies de *Passiflora*, 10 artigos se referem à espécie *P. edulis*. Tais artigos apontam para a presença de diferentes propriedades neurofarmacológicas dos extratos desta espécie, tais como atividade hipno-sedativa (VALLE E LEITE, 1983; MALUF et al., 1991; BRUSCHI et al., 2002) e tipo-ansiolítica (PETRY et al., 2001; DE-PARIS et al., 2002; REGINATTO et al., 2006; BARBOSA et al., 2008). No entanto, todos os trabalhos mencionados relatam essas atividades biológicas para extratos provenientes das folhas de *P. edulis*, não existindo relatos disponíveis na literatura a respeito de possíveis atividades neurofarmacológicas de outras partes da planta.

Em função disto, nos interessamos em investigar as potencialidades neurofarmacológicas desta espécie. A parceria existente entre o Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia (CCB) e o Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas (CCS), ambos pertencentes à Universidade Federal de Santa Catarina, tornou possível este estudo, uma vez que a doutoranda Silvana Zucolotto Langassner, sob orientação do Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, já realizava seu trabalho de doutorado com a referida espécie e dispunha de quantidade suficiente de material que permitiria a investigação farmacológica. Assim, com o objetivo de investigar a possível atividade neurofarmacológica de diferentes partes da espécie *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*, realizou-se este trabalho de doutorado.

O estudo se iniciou com a investigação da possível atividade neurofarmacológica dos extratos aquosos obtidos a partir das folhas,

raízes e casca dos frutos de *P. edulis*, além do suco obtido a partir da polpa dos frutos. Como pode ser observado, seria um número relativamente grande de extratos a serem testados e para os quais não eram conhecidas as doses eficazes, nem os tempos de ação neurofarmacológica. Em função destas questões, mostrou-se imprescindível a escolha de um teste que se mostrasse viável em relação ao tempo de execução e ao número de animais utilizados, além de ser capaz de fornecer dados confiáveis a respeito da faixa de dose e de tempo de ação dos extratos a serem testados. Assim, foi escolhido para esta avaliação inicial o teste da hipertermia induzida por estresse (HIE).

A HIE é caracterizada por um aumento temporário da temperatura corporal e é parte integrante do repertório de respostas individuais dos animais frente a situações percebidas como estressantes, ocorrendo de maneira comparável entre todas as espécies (REEVES et al., 1985; MARAZZITI et al., 1992; VINKERS et al., 2008). Esse fenômeno é mediado pelo sistema nervoso e ocorre antes e durante a exposição a situações que geram ansiedade. Em formas patológicas humanas, representa um dos sintomas dos transtornos de ansiedade. Realmente, a hiper-reatividade autonômica, quando presente de forma exacerbada, representa um dos itens de diagnóstico da ansiedade generalizada presente no DSM-IV (Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais, 4ª. edição – AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994). O teste da HIE em camundongos é um teste desenvolvido há alguns anos para representar a expressão da hiper-reatividade autonômica na ansiedade (BORSINI et al., 1989; LECCI et al., 1990; ZETHOF et al., 1994). Neste teste, o fenômeno é explorado da seguinte forma: após a remoção individual dos camundongos de uma caixa-moradia, um aumento gradual da temperatura dos animais restantes pode ser observado. Esta elevação da temperatura corporal é interpretada como um sinal de ansiedade antecipatória experimentada pelos animais que ficaram na caixa ao perceberem a remoção dos primeiros (BORSINI et al., 1989; VAN DER HEYDEN et al., 1997). O teste da HIE já foi validado farmacologicamente e, atualmente, é considerado um teste robusto e reprodutível com grande sensibilidade a compostos ansiolíticos atualmente disponíveis no mercado (LECCI et al., 1990; BOUWKNECHT et al., 2000; GRUNDMANN et al., 2006; BOUWKNECHT et al., 2007; VINKERS et al., 2008; VINKERS et al., 2009a,b). Além disso, este teste tem apresentado grande sensibilidade para identificação de novos compostos com tal ação. Em sua forma

original, no entanto, o teste da HIE mostrava-se muito trabalhoso no sentido de consumir muito tempo, ocupar muito espaço e, mais importante em função da questão ética, necessitava de uma quantidade extremamente grande de animais. Felizmente, uma modificação do teste, em camundongos, foi descrita em 1997, por VAN DER HEYDEN e colaboradores. Nesta modificação, os animais passaram a ser alojados individualmente e não mais em grupos. Isto tornou o modelo mais acessível para a avaliação rápida de compostos com atividade tipo-ansiolítica através de uma medida fisiológica, a temperatura (SPOOREN et al., 2002).

No presente trabalho, antes de realizar a avaliação da possível atividade neurofarmacológica dos extratos de diferentes partes de *P. edulis*, portanto, foi realizada a padronização do teste da HIE em animais isolados, uma vez que o mesmo não havia ainda sido utilizado em nosso laboratório com esta modificação proposta por VAN DER HEYDEN e colaboradores (1997). Além disso, o trabalho mencionado não investigou o efeito da via oral de tratamento sobre a hipertermia e consideramos adequado verificar possíveis diferenças entre as vias de administração. Os dados obtidos nesse experimento de padronização, e indicados na Figura 17, mostram que, em T1, os animais tratados com salina, tanto por via i.p. quanto por v.o., apresentaram hipertermia quando comparados ao grupo não tratado; os animais tratados com DZP, por sua vez, via i.p. ou v.o., não apresentaram hipertermia quando comparados ao grupo não tratado, o que indica a eficácia da droga-padrão ansiolítica DZP neste teste, independentemente da via de administração. Quando comparamos as temperaturas dos diferentes grupos de tratamento em T1, estamos avaliando os efeitos dos diferentes tratamentos e vias de administração sobre a hipertermia induzida pelo estresse da manipulação e do procedimento de tratamento. Quando comparamos as temperaturas entre T1 e T2, estamos avaliando, além dos efeitos dos diferentes tratamentos, a influência do procedimento de medição sobre a temperatura dos animais. Em outras palavras, ao compararmos as medidas de T1 e T2, avaliamos se o procedimento de medição em si é capaz de produzir aumento da temperatura, isto é, se é um estressor *per se*. Em T2, os animais do grupo não tratado passaram a apresentar a hipertermia, quando suas temperaturas foram comparadas com as obtidas em T1, o que indica que o procedimento de medição representa um estressor suficiente para produzir a hipertermia. Ainda em T2, os animais tratados com salina por via i.p. não apresentaram mais

elevação da temperatura quando comparados às suas próprias temperaturas em T1, ao contrário dos animais tratados com salina por v.o., os quais apresentaram temperaturas significativamente mais elevadas. Este resultado sugere que a via oral de administração representa um estressor mais potente do que a via intraperitoneal, capaz de produzir hipertermia. Os grupos tratados com DZP, v.o. ou i.p., continuaram sem apresentar HIE, sendo que o grupo tratado com DZP v.o. apresentou, ainda, uma diminuição significativa da temperatura quando comparado a T1.

Esses resultados permitem diferentes conclusões. As observações obtidas em T1 permitem concluir que o próprio procedimento de manipulação e tratamento, seja oral ou intraperitoneal, representa um estressor capaz de elevar a temperatura, causando hipertermia, uma vez que os animais tratados com salina apresentaram hipertermia quando comparados aos não tratados. Esse resultado está de acordo com estudos prévios, os quais sugerem que o procedimento de manuseio dos animais e de tratamento são estressores capazes de produzir hipertermia *per se* (VAN DER HEYDEN et al., 1997; VINKERS et al., 2009a). Além disso, nossos resultados validam farmacologicamente o teste da HIE, uma vez que os animais tratados com DZP, ansiolítico padrão, não apresentaram hipertermia. Diferentes autores já demonstraram que o teste da HIE é realmente eficaz em detectar os efeitos tipo-ansiolíticos de agonistas do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} assim como de agonistas GABA_A-benzodiazepínicos utilizados clinicamente com sucesso (LECCI et al., 1990; ZETHOF et al., 1995; OLIVIER et al., 2002; 2003; CRYAN et al., 2004). Ademais, os resultados mostraram que o procedimento de medição da temperatura representa um estressor capaz de induzir a hipertermia nos animais, uma vez que os animais que não receberam nenhum tratamento e que, portanto, não passaram pelo estresse do procedimento de tratamento, apresentaram hipertermia em T2. Esse resultado está de acordo com dados disponíveis na literatura, os quais afirmam que a inserção do *probe* retal para medir a temperatura induz uma resposta hipertérmica significativa entre 5 a 20 min, retornando ao nível basal em aproximadamente 60 min (VAN DER HEYDEN et al., 2007; BOUWKNECHT et al., 2000; VINKERS et al., 2009a), se não houver repetição do procedimento, atestando a validade do modelo de hipertermia induzida pelo estresse, neste caso representado pelo procedimento de medição. O fato do tratamento com salina por v.o.

aumentar ainda mais a temperatura dos animais em T2, o que não foi observado para o tratamento por via i.p., sugere que a via oral de tratamento é um estressor mais potente para os animais do que a via intraperitoneal. Esse é um resultado de grande relevância, principalmente quando se considera que grande parte dos estudos de etnofarmacologia de plantas medicinais é realizada utilizando-se a via oral, que poderia, portanto, produzir algum tipo de alteração nos resultados observados em função do estresse produzido. De fato, tem sido demonstrado, no teste da HIE, que a amplitude da resposta hipertérmica é dependente da intensidade do estressor (VAN DER HEYDEN et al., 1997; BOUWCKNECHT et al., 2007). Ou seja, quando o animal é gentilmente manuseado não há alteração significativa da temperatura, a menos que isso seja feito repetidamente (VAN DER HEYDEN et al., 1997; BOUWCKNECHT et al., 2007). Portanto, se em T2 foi observado que o tratamento por via oral produziu aumento ainda maior da temperatura, sugere-se que esta via de tratamento seja considerada um estressor moderado para a indução da hipertermia e que pode ser utilizada como modelo de estresse *per se*. A grande amplitude de variação da temperatura observada entre T1 e T2, estabelecida em relativamente pouco tempo (10 min), causada pelo procedimento de medição e evidenciada pelo grupo não tratado, também contribui para a validação do teste e também está de acordo com dados já publicados, os quais afirmam que, dentro de 15 min, a temperatura deve aumentar rapidamente em cerca de $1,0 \pm 1,5$ °C (VAN DER HEYDEN et al., 1997; VINKERS et al., 2009a). Alguns autores afirmam ainda que esta elevação brusca da temperatura é parte do repertório normal do comportamento de defesa dos animais, sendo considerada importante para a sobrevivência da espécie em função de preparar o organismo para o comportamento de luta-ou-fuga (VINKERS et al., 2009a).

Tendo sido considerado, portanto, eficaz para a detecção rápida e precisa dos efeitos de compostos com potencial atividade neurofarmacológica, o teste da HIE em animais isolados foi utilizado para a avaliação dos efeitos de diferentes partes da espécie *P. edulis*. A validade do procedimento utilizado foi novamente comprovada em todos os experimentos realizados, uma vez que os animais do grupo controle apresentaram a HIE nos diferentes tempos (30 min, 1 h e 2 h após o tratamento por via oral).

O tratamento com o EA obtido a partir do pericarpo dos frutos de *P. edulis* impediu a ocorrência da HIE nas duas maiores doses

testadas (600 e 1000 mg/kg) já a partir do primeiro tempo de observação, 30 min após o tratamento oral, quando comparadas ao grupo controle. Além de tal efeito ter permanecido no segundo tempo de medição, as duas menores doses (100 e 300 mg/kg) também passaram a apresentar efeito protetor da ocorrência de HIE, efeito esse que permaneceu no terceiro tempo de medição da temperatura, 2 h após o tratamento, indicando um potencial efeito neurofarmacológico do pericarpo dos frutos de *P. edulis*.

O tratamento com o suco obtido a partir dos frutos, por sua vez, impediu significativamente a ocorrência da HIE no primeiro tempo de observação apenas na dose maior, 1000 mg/kg. No segundo tempo, 1 h após o tratamento, a dose de 600 mg/kg também passou a apresentar efeito protetor da HIE, efeitos esses que se mantiveram 2 h após o tratamento, agora também com o aparecimento de efeito significativo na dose de 100 mg/kg.

O tratamento com o EA das folhas de *P. edulis* mostrou efeitos semelhantes ao obtido com o suco dos frutos, ou seja, após 30 min do tratamento, a dose de 1000 mg/kg impediu a ocorrência da HIE quando comparada ao grupo controle; 1 h após o tratamento, as doses de 600 e 1000 mg/kg apresentaram efeito significativo e esse efeito se manteve no tempo de 2 h após o tratamento.

Já o tratamento com o EA das raízes de *P. edulis*, por sua vez, não foi tão eficaz quanto os demais extratos na proteção contra a HIE nos animais. Apenas a dose de 1000 mg/kg impediu significativamente a ocorrência da HIE no tempo de 1 h após o tratamento, sendo as demais doses ineficazes em quaisquer dos tempos de observação.

Pelo que se encontra disponível na literatura, não existem até o momento estudos sobre os efeitos de espécies de *Passiflora* no teste da HIE, sendo este o primeiro trabalho neste sentido. Na realidade, apenas quatro trabalhos encontram-se disponíveis na literatura a respeito dos efeitos de espécies vegetais no teste da HIE (AKUTSU et al., 2002; 2003; CHEN et al., 2004; GRUNDMANN et al., 2006). Em um destes estudos, os autores investigaram os efeitos do extrato de *Hypericum perforatum*, conhecido popularmente como erva-de-São-João e amplamente utilizado em diferentes países no tratamento da depressão leve a moderada, e de seus compostos isolados, no teste da HIE (GRUNDMANN et al., 2006). Neste trabalho, os autores afirmam que tanto o extrato de *H. perforatum* como alguns de seus compostos isolados impediram a ocorrência da HIE em camundongos. Além disso,

os flavonoides presentes nesta espécie vegetal, hiperosídeo, isoquercitrina, quercitrina e rutina, também mostraram um bloqueio parcial da HIE, diferentemente do que foi observado para o tratamento com DZP – o qual bloqueou totalmente a ocorrência da HIE – e de maneira semelhante ao que foi observado no tratamento com a buspirona. Os autores afirmam, ainda, que o inibidor “misto” da recaptação de noradrenalina e serotonina, a imipramina, bem como o inibidor seletivo da recaptação de serotonina, a fluoxetina, não mostraram eficácia na inibição da HIE, o que sugere que o aumento da neurotransmissão monoaminérgica talvez não desempenhe um papel importante no antagonismo da HIE. No entanto, à medida que o tratamento com a buspirona, agonista parcial de receptores 5-HT_{1A}, foi capaz de bloquear parcialmente a HIE, e que os flavonoides isolados mostraram o mesmo perfil de atividade, os autores discutem o possível mecanismo de ação de tais flavonoides como sendo decorrente de uma ação sobre essa classe de receptores de serotonina.

Os resultados obtidos em nosso trabalho também podem ser interpretados utilizando-se a mesma linha de raciocínio: o teste da HIE já se encontra bem validado farmacologicamente e drogas ansiolíticas com mecanismo de ação benzodiazepínico e agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} mostram-se eficazes em bloquear a resposta de HIE (OLIVIER et al., 2002; BOUWKNECHT et al., 2007; VINKERS et al., 2009a). Além disso, drogas que agem via mecanismos dopaminérgicos, noradrenérgicos e bloqueadores da recaptação de serotonina não mostram qualquer tipo de efeito na prevenção da ocorrência de HIE (GRUNDMANN et al., 2006; BOUWKNECHT et al., 2007; VINKERS et al., 2009a). Mais ainda, alguns estudos têm mostrado que, enquanto diferentes agonistas de receptores 5-HT_{1A} mostram-se ativos no teste da HIE, nenhum agonista 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} ou 5-HT_{2C} mostra-se eficaz em reduzir a amplitude da hipertermia em animais experimentais (LECCI et al., 1990; ZETHOF et al., 1995). Antagonistas de receptores 5-HT_{2A/2C} ou 5-HT₃ também não apresentam perfil tipo-ansiolítico neste teste (BORSINI et al., 1993; LECCI et al., 1990; ZETHOF et al., 1995). Outros trabalhos ainda confirmam que moduladores dos transportadores de serotonina, liberadores de serotonina ou inibidores da monoaminaoxidase também se mostram inativos no teste da HIE (GROENINK et al., 2003; ZETHOF et al., 1995), bem como os antidepressivos tricíclicos (BORSINI et al., 1989; VAN DER HEYDEN et al., 1997; ZETHOF et al., 1995). Tomados em

conjunto e considerando esses fatos, poder-se-ia sugerir que os efeitos das diferentes partes de *P. edulis* no teste da HIE, observados em nosso trabalho, talvez estivessem sendo produzidos via ação dos compostos presentes em tais extratos sobre o sistema de neurotransmissão GABA-benzodiazepínico ou via agonismo, parcial ou total, de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}. No entanto, neste ponto do trabalho, tais inferências seriam por demais especulativas, uma vez que em apenas uma triagem farmacológica não seria possível obter respostas dessa magnitude.

Uma questão adicional, e não menos relevante, levantada inclusive durante o exame de qualificação desta tese de doutorado, diz respeito ao questionamento sobre o quanto estes efeitos observados para as diferentes partes de *P. edulis* representariam realmente um efeito neurofarmacológico do tipo-ansiolítico ou se algum outro mecanismo biológico poderia ter sido ativado por esses extratos que culminasse na redução da temperatura. Pesquisadores do nosso grupo realmente encontraram atividade antiinflamatória após o tratamento com extratos das folhas de *P. edulis* em animais experimentais (BENINCÁ et al., 2007; MONTANHER et al., 2007; ZUCOLOTTO et al., 2009). No entanto, diferentes trabalhos já confirmaram que o teste da HIE não se mostra sensível ao tratamento com fármacos antiinflamatórios. O tratamento com ácido acetilsalicílico e outras drogas antiinflamatórias, por exemplo, não reduz de maneira eficaz a amplitude da temperatura dos animais (ZETHOF et al., 1995; OLIVIER et al., 2003), o que indica que o aumento da temperatura observado neste teste não representa uma resposta de febre como a que é induzida por interleucinas e lipopolissacarídeos. Isso indica que os efeitos observados em nosso trabalho no teste da HIE dizem respeito realmente a um efeito neurofarmacológico, incentivando a continuidade das investigações a respeito deste perfil de ação biológica.

Comparativamente, pode-se observar pelos resultados que, em termos de eficácia de ação, os extratos provenientes das diferentes partes de *P. edulis* possuem diferentes potências de ação neurofarmacológica. Assim, o extrato com ação biológica mais proeminente parece ser o obtido a partir do pericarpo dos frutos, seguido pelo suco dos frutos, extrato das folhas e, por último, extrato das raízes. Esse resultado mostrou-se muito surpreendente por diferentes razões. Embora os efeitos centrais do EA das folhas de *P. edulis* não sejam novidade na literatura científica, uma vez que diferentes autores já indicaram presença de

atividade hipno-sedativa e tipo-ansiolítica desta parte da planta (VALLE E LEITE, 1983; MALUF et al., 1991; PETRY et al., 2001; BRUSCHI et al., 2002; DE-PARIS et al., 2002; COLETA et al., 2006; REGINATTO et al., 2006; BARBOSA et al., 2008), o efeito tipo-ansiolítico do extrato do pericarpo dos frutos observado em nossos resultados, representado pela proteção contra a hipertermia, é um resultado inédito e surpreendente. Isso porque o pericarpo dos frutos nada mais é do que, em linguagem coloquial, a casca dos frutos, que é simplesmente rejeitada como resíduo, tanto pela população quanto pela indústria alimentícia, que utiliza a polpa dos frutos no preparo de bebidas e demais produtos à base de maracujá.

Como já mencionado na Introdução desta tese, o consumo *per capita* de maracujá aumentou mais de 230% em nove anos e a produção dos frutos no ano de 2003 foi superior a 480 mil toneladas (CÓRDOVA et al., 2005). Considerando que 95% de toda a produção brasileira de maracujá se refere à espécie *P. edulis* (MELETTI E BRÜCKNER, 2001), tem-se uma produção estimada em cerca de 450 mil toneladas de frutos desta espécie. Estima-se que entre 65 e 70% do peso do maracujá seja rejeitado na forma de cascas e sementes (REIS et al., 2000). Considerando as quantidades mencionadas, portanto, teriam sido produzidas, apenas no ano de 2003, mais de 300 mil toneladas de cascas e sementes. De acordo com alguns autores, 90% dessas cascas seriam desperdiçadas, sendo o restante utilizado no preparo de ração animal (OLIVEIRA et al., 2006). A disposição final desse resíduo orgânico pode gerar um problema para os gestores ambientais, de maneira semelhante ao que ocorre com cascas de outros frutos de espécies vegetais brasileiras (ARAÚJO et al., 2004). Desta forma, alguns autores já enfatizaram a necessidade de se estudar uma forma de aproveitamento racional e eficiente do “resíduo” representado pelas cascas dos frutos do maracujá (OLIVEIRA et al., 2002; RAMOS et al., 2007).

A despeito da grande utilização popular das espécies do gênero *Passiflora* e do grande número de trabalhos existentes na literatura acerca das mesmas, não existiam, até o momento, estudos sobre as propriedades neurofarmacológicas do pericarpo dos frutos de *P. edulis*. Na verdade, apenas dois trabalhos foram encontrados a respeito dos efeitos farmacológicos do pericarpo dessa espécie. O primeiro indicou um efeito anti-hipertensivo após o tratamento com o extrato da casca em ratos espontaneamente hipertensos (ICHIMURA et al., 2006). O segundo trabalho, realizado por pesquisadores brasileiros, investigou os

efeitos da farinha da casca de maracujá em mulheres de 30 a 60 anos as quais apresentavam hipercolesterolemia. Neste último trabalho, os autores observaram que, após o tratamento contínuo, houve uma redução significativa dos níveis de colesterol nessas pacientes, quando comparadas ao grupo controle; no entanto, as pacientes testadas relataram, como um efeito colateral, a presença de forte sonolência após o tratamento (RAMOS et al., 2007).

Assim, considerando a grande disponibilidade de matéria-prima; a possibilidade de investigar a potencialidade terapêutica de algo considerado “resíduo” até então; a ausência de estudos sobre esta parte da planta; e os efeitos centrais por nós observados no teste da HIE, este trabalho passou a concentrar seus esforços na investigação neurofarmacológica do pericarpo dos frutos da espécie *P. edulis*, com o objetivo de estudar tanto a atividade do extrato total quanto de elucidar os compostos possivelmente envolvidos em sua atividade neurofarmacológica. Para tanto, passamos a investigar o perfil de ação neurofarmacológica do EA do pericarpo, utilizando o teste do sono induzido por éter etílico para investigação de sua possível atividade hipno-sedativa; o teste das convulsões induzidas por PTZ para investigar sua possível atividade anticonvulsivante; o teste da transição claro-escuro para investigação do possível efeito tipo-ansiolítico e, por fim, o teste da suspensão pela cauda para investigar sua possível atividade tipo-antidepressiva. As doses escolhidas do EA do pericarpo de *P. edulis* foram as duas menores doses a apresentar efeito significativo contra a elevação da temperatura no teste da HIE, 100 e 300 mg/kg, com um tempo de ação de 1 h após o tratamento por via oral.

No teste do sono induzido por éter etílico, as duas doses testadas reduziram significativamente a latência para início do sono, bem como aumentaram também de maneira significativa o tempo total de duração do sono, quando comparadas ao grupo controle, de maneira similar ao que ocorreu com o tratamento com DZP, indicando atividade hipno-sedativa do EA do pericarpo de *P. edulis*. Geralmente, o teste mais utilizado para avaliação de possíveis propriedades hipno-sedativas de compostos com ação central desconhecida é o teste do sono induzido por barbitúricos, como o pentobarbital sódico (CARLINI et al., 1986). No entanto, os compostos de plantas promovem interações farmacocinéticas com os barbitúricos em função de sua interação com o complexo do citocromo P450, o que pode levar à potencialização dos efeitos depressores centrais e, consequentemente, a resultados falso-

positivos de compostos desprovidos de ação hipno-sedativa. Em função disso, VIEIRA (2001) desenvolveu o teste do sono induzido por éter etílico. Considerando o fato de que o éter etílico não possui metabolização hepática, o aumento da duração do sono observado após o tratamento com EA do pericarpo, observado neste trabalho, confirma sua ação hipno-sedativa. Efeitos hipnóticos e sedativos após o tratamento com as folhas de *P. edulis* já foram relatados anteriormente (VALLE E LEITE, 1983; MALUF et al., 1991; BRUSCHI et al., 2002), bem como para outras espécies de *Passiflora* (OGA et al., 1984; SPERONI E MINGUETTI, 1988; SPERONI et al., 1996; SOULIMANI et al., 1997; CAPASSO E SORRENTINO, 2005; LOLLI et al., 2007). MALUF e colaboradores (1991) discutem o efeito potencializador do sono induzido por pentobarbital, observado após o tratamento com as folhas de *P. edulis*, em função da possível presença de ácidos tânico nessa parte da planta, embora não tenham realizado avaliações fitoquímicas que comprovassem tal hipótese. Já BRUSCHI e colaboradores (2002) afirmam que a atividade hipno-sedativa observada para as folhas de *P. edulis* está relacionada ao teor de flavonoides identificados nas mesmas. OGA e colaboradores (1984) discutem o efeito hipno-sedativo observado após o tratamento com o extrato das folhas de *P. alata* como sendo decorrentes da presença de alcaloides e flavonoides. SPERONI E MINGUETTI (1988), investigando os efeitos de diferentes extratos e frações obtidos das partes aéreas de *P. incarnata*, também observaram efeitos hipno-sedativos no teste do sono induzido por pentobarbital para a fração rica em flavonoides. LOLLI e colaboradores (2007) também discutem o efeito hipno-sedativo observado após o tratamento com o extrato de *P. actinia* em função da possível presença de flavonoides, embora não tenham realizado a investigação fitoquímica de tal extrato. Em todos esses estudos, entretanto, o teste utilizado foi o teste do sono induzido por barbitúricos. Portanto, nosso trabalho representa o primeiro estudo investigando as reais propriedades hipno-sedativas de *P. edulis* utilizando o teste do sono induzido por éter etílico.

O segundo teste utilizado para a avaliação do perfil neurofarmacológico do EA do pericarpo de *P. edulis* foi o teste das convulsões induzidas por PTZ. Este teste é considerado o principal modelo experimental agudo para a avaliação preliminar de drogas com potencial atividade anticonvulsivante (SWINYARD et al., 1952; CZUCZUWAR E FREY, 1986). Drogas que impedem a ocorrência das

convulsões induzidas por PTZ, ou que aumentam a latência ou diminuem a duração e a severidade ou a letalidade das mesmas, correlacionam-se positivamente com drogas utilizadas terapeuticamente no tratamento das epilepsias do tipo *crise de ausência* em humanos. Alguns autores propõem ainda que este teste é também eficaz para avaliar a ação tipo-ansiolítica de compostos do tipo benzodiazepínicos, os quais agem sobre receptores GABAérgicos (TALLMAN et al., 1980). No presente trabalho, o tratamento com o EA do pericarpo de *P. edulis* não se mostrou eficaz na prevenção da ocorrência de convulsões induzidas pelo PTZ, pelo menos nas doses testadas, uma vez que não alterou nenhum dos parâmetros observados de maneira significativa quando comparado ao grupo controle. Já o tratamento com a droga-padrão DZP, um agonista de receptores GABA_A, aumentou significativamente a latência para a ocorrência da primeira convulsão, além de diminuir a severidade das mesmas, promovendo, portanto, um efeito protetor das convulsões. A ausência de efeitos protetores do EA do pericarpo de *P. edulis* contra as convulsões induzidas por PTZ sugere que a atividade neurofarmacológica desse extrato talvez não esteja relacionada especificamente à interação com receptores GABAérgicos ou, pelo menos, com o sítio benzodiazepínico de tais receptores, uma vez que este teste é considerado eficaz para a avaliação de compostos com esse perfil de ação (TALLMAN et al., 1980). Embora existam trabalhos na literatura relatando efeito anticonvulsivante de extratos das folhas de espécies de *Passiflora*, esses estudos dizem respeito às espécies *P. incarnata* (SPERONI E MINGUETTI, 1988; SPERONI ET AL et al., 1996; NASSIRI-ASL et al., 2007) e *P. alata* (OGA et al., 1984). A ausência de atividade anticonvulsivante observada em nosso estudo para o EA do pericarpo de *P. edulis* está de acordo com trabalhos anteriores, os quais apontam ausência de atividade anticonvulsivante de extratos das folhas de *P. edulis* no teste das convulsões induzidas por PTZ (VALLE E LEITE, 1983; MALUF et al., 1991).

Para dar continuidade à investigação da potencial atividade tipo-ansiolítica do EA do pericarpo de *P. edulis* foi utilizado o teste da transição claro-escuro. Este teste foi desenvolvido em 1980 por CRAWLEY E GOODWIN e consiste em uma caixa contendo dois compartimentos, um escuro e um intensamente iluminado, os quais se comunicam por meio de uma porta divisória, tendo sido inicialmente desenvolvido para avaliar os efeitos tipo-ansiolíticos de drogas benzodiazepínicas. O teste se baseia na aversão inata de roedores por

áreas iluminadas e no comportamento exploratório dos animais em ambientes novos (HASCOËT et al., 2001). Os autores do trabalho inicial relatam uma facilitação dose-dependente da atividade exploratória entre os dois compartimentos após a administração de drogas benzodiazepínicas (CRAWLEY E GOODWIN, 1980). Diferentes autores afirmam que o tempo de permanência no compartimento claro do modelo representa uma medida capaz de fornecer um índice seguro de comportamento relacionado à ansiedade, enquanto que a medida do número de transições entre compartimentos estaria correlacionada à atividade motora dos animais (COSTALL et al., 1988; MERLO PICH E SAMANIN, 1989; SÁNCHEZ, 1996 e 1997; BOURIN E HASCOËT, 2003; SENA et al., 2003). Dados comportamentais, inclusive, sugerem que camundongos *naive* preferem o compartimento escuro, onde tendem a passar cerca de 60% do tempo (BOURIN E HASCOËT, 2003). Mesmo tendo sido inicialmente desenvolvido para avaliar os efeitos de compostos benzodiazepínicos, diferentes trabalhos utilizam o teste da transição claro-escuro para avaliar os efeitos de compostos serotoninérgicos, como o agonista 5-HT_{1A} buspirona (COSTALL et al., 1988; SÁNCHEZ, 1995; 1996; DRINGENBERG et al., 1998; SENA et al., 2003). No presente trabalho, as duas doses do EA do pericarpo de *P. edulis* testadas aumentaram significativamente o tempo total de permanência no compartimento claro do teste, de maneira semelhante ao observado para o DZP, indicando um perfil de ação do tipo-ansiolítico. No entanto, o teste da transição claro-escuro é limitado por apresentar resultados falso-positivos quando a droga em teste mostra atividade sedativa ou estimulante geral; assim, drogas que afetam o funcionamento motor geral podem afetar o desempenho dos animais na caixa claro-escuro. Isto posto, é recomendável avaliar a influência da substância em teste sobre a atividade locomotora dos animais, a fim de eliminar possíveis falso-positivos (BOURIN E HASCOËT, 2003). Assim, para investigar a possível influência do tratamento com o EA do pericarpo sobre o comportamento locomotor, os animais foram testados no campo aberto imediatamente após o teste da transição claro-escuro. Ambas as doses testadas não alteraram de maneira significativa os parâmetros observados no campo aberto, quando comparadas ao grupo controle, indicando que o efeito observado no teste da transição claro-escuro representa realmente um efeito tipo-ansiolítico desprovido de ação sedativa ou estimulante geral. O efeito tipo-ansiolítico de espécies de *Passiflora*, inclusive de *P. edulis*, já foi bastante descrito na literatura,

tanto em animais experimentais como na clínica. O tratamento com *P. incarnata* em pacientes com transtorno de ansiedade generalizada mostrou eficácia comparável ao oxazepam, sem prejuízos no desempenho profissional (AKHONDZADEH et al., 2001b). O tratamento com cápsulas contendo extrato de *P. incarnata* também promoveu efeito ansiolítico em pacientes, sem promover mio-relaxamento (ANSSEAU, 2004). Em animais experimentais, o tratamento com o extrato das folhas de *P. edulis* promoveu aumento do tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, um dos testes mais utilizados para avaliação da possível atividade tipo-ansiolítica de compostos com perfil de ação desconhecida, em diferentes estudos (PETRY et al., 2001; DE-PARIS et al., 2002; COLETA et al., 2006; REGINATTO et al., 2006; BARBOSA et al., 2008). BARBOSA e colaboradores (2008) demonstraram, ainda, que o efeito tipo-ansiolítico observado para as folhas da espécie é desprovido de prejuízos em processos de memória, avaliado no teste da esQUIVA inibitória. Além de *P. edulis*, outras espécies de *Passiflora* também já tiveram sua atividade tipo-ansiolítica relatada. O tratamento com o extrato das folhas de *P. alata* produziu efeitos tipo-ansiolíticos em animais experimentais submetidos ao labirinto em cruz elevado (PETRY et al., 2001; DE-PARIS et al., 2002; REGINATTO et al., 2006; BARBOSA et al., 2008), bem como de *P. actinia* (SANTOS et al., 2006; LOLLI et al., 2007) e *P. quadrangularis* (CASTRO et al., 2007). Como pode ser observado, a grande maioria dos trabalhos que relata a existência de um efeito tipo-ansiolítico, tanto de *P. edulis* quanto de outras espécies de *Passiflora*, utilizaram, em suas investigações, o teste do labirinto em cruz elevado. Apenas dois trabalhos foram encontrados relatando efeitos do tipo ansiolítico utilizando outros testes, como o teste de esconder esferas (COLETA et al., 2006) e o teste da placa perfurada (CASTRO et al., 2007). Nosso trabalho é, portanto, o primeiro a investigar o efeito tipo-ansiolítico de espécies de *Passiflora* utilizando o teste da transição claro-escuro, com resultados comparáveis aos já existentes na literatura para tais espécies. É importante mencionar que, embora este seja o primeiro estudo sobre os efeitos de espécies de *Passiflora* no teste da transição claro-escuro, outras espécies vegetais com perfil de ação neurofarmacológica já bem esclarecido também tiveram sua atividade tipo-ansiolítica confirmada utilizando este mesmo teste. FLAUSINO JR. e colaboradores (2002) demonstraram o efeito tipo-ansiolítico de *Hypericum perforatum*, comparável ao efeito observado para o tratamento com lorazepam e

bloqueado pelo antagonista benzodiazepínico flumazenil, utilizando o teste da transição claro-escuro. Resultados semelhantes foram obtidos após o tratamento com extratos de *Erythrina mulungu*, conhecida popularmente como mulungu e nativa do sudeste brasileiro, ou com alcaloides isolados a partir de suas flores, também utilizando o teste da transição claro-escuro (ONUSIC et al., 2003; FLAUSINO JR. et al., 2007a; 2007b).

Após a confirmação do efeito tipo-ansiolítico do EA do pericarpo de *P. edulis* no teste da transição claro-escuro, investigamos sua possível atividade tipo-antidepressiva utilizando o teste da suspensão pela cauda. O teste da suspensão pela cauda é um dos testes mais utilizados para investigação da potencial atividade tipo-antidepressiva de compostos com ação neurofarmacológica. Baseia-se na observação de que os roedores, após o comportamento inicial de tentar ativamente escapar, desenvolvem uma postura de imobilidade quando colocados em uma situação de estresse inescapável (STÉRU et al., 1985; BOURIN et al., 2005; CRYAN et al., 2005). A imobilidade é interpretada como o declínio da persistência em tentar escapar da situação estressante, através do estabelecimento de um comportamento passivo do animal (STÉRU et al., 1985; CRYAN et al., 2005). Considerando que drogas antidepressivas utilizadas na clínica promovem e aumentam o engajamento dos animais em comportamentos direcionados à tentativa de escape, a redução do tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda tem sido interpretada como um indicativo de atividade tipo-antidepressiva em camundongos (STÉRU et al., 1985; BOURIN et al., 2005; CRYAN et al., 2005). Este teste apresenta algumas vantagens quando comparado a outros testes, como sua habilidade em detectar os efeitos de um amplo espectro de drogas antidepressivas, independentemente de seus mecanismos de ação, além de seu baixo custo, sua metodologia simples e de não necessitar treinamento prévio (BOURIN et al., 2005; CRYAN et al., 2005). Por exemplo, o teste do nado forçado, também muito utilizado para detectar os efeitos de drogas antidepressivas, não tem se mostrado tão eficaz na detecção da atividade de inibidores seletivos da recaptação de serotonina, embora exista certa polêmica a este respeito (CRYAN et al., 2005; JACOBSON E CRYAN, 2007). Essas vantagens tornam o teste da suspensão pela cauda particularmente interessante para o presente estudo, uma vez que investigamos a atividade tipo-antidepressiva de compostos com mecanismos de ação desconhecidos até o momento. O

tratamento com as duas doses do EA do pericarpo de *P. edulis* aumentou significativamente a latência para a primeira imobilidade, além de reduzir significativamente o tempo total de imobilidade, quando comparadas ao grupo controle, de maneira semelhante aos efeitos observados após tratamento com imipramina, antidepressivo padrão. Em conjunto, esses dados sugerem a existência de um perfil de ação do tipo-antidepressivo para esta parte da planta. Outras espécies vegetais amplamente utilizadas no tratamento de transtornos depressivos também já tiveram seus efeitos observados em animais de experimentação utilizando o teste da suspensão pela cauda, como diferentes espécies do gênero *Hypericum* (SÁNCHEZ-MATEO et al., 2007). Esses dados se tornam relevantes não apenas em função desta ação neurofarmacológica em si, mas, principalmente, quando se considera o fato de que, embora exista atualmente um grande número de estudos sobre os efeitos neurofarmacológicos de espécies do gênero *Passiflora*, tais estudos são voltados à investigação da atividade do tipo ansiolítica, sedativa, hipnótica, anticonvulsivante, entre outros efeitos centrais. Portanto, este trabalho representa a primeira investigação sobre os efeitos do tipo antidepressivo de espécies de maracujá em modelos experimentais, o que torna esses resultados ainda mais interessantes.

Tendo sido caracterizada algumas atividades neurofarmacológicas do EA do pericarpo de *P. edulis* em diferentes testes comportamentais, o próximo passo foi fracionar o EA de forma a permitir o biomonitoramento do extrato. O procedimento de fracionamento foi realizado pelo Laboratório de Ciências Farmacêuticas do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Santa Catarina, sob supervisão do Prof. Dr. Eloir P. Schenkel, e fez parte da tese de doutoramento de Silvana Zucolotto Langassner. Desta forma, o passo seguinte foi avaliar os efeitos neurofarmacológicos da fração butanólica (FB) e da fração aquosa residual (FAR). Para realizar o fracionamento biomonitorado e evitar o uso de uma grande quantidade de animais experimentais, foram escolhidos, para as investigações subsequentes, os testes comportamentais nos quais o EA do pericarpo apresentou os efeitos mais evidentes: o teste da transição claro-escuro e o teste da suspensão pela cauda.

No teste da transição claro-escuro, o tratamento com a FB do pericarpo de *P. edulis*, aumentou significativamente, nas três doses testadas, tanto o número de transições entre compartimentos, quanto o tempo total de permanência no compartimento claro da caixa, da mesma

maneira que o observado para o tratamento com DZP, indicando um efeito tipo-ansiolítico desta fração, de forma semelhante ao que havia sido observado no tratamento com o EA. Já o tratamento com a FAR não causou nenhuma alteração dos parâmetros observados, em nenhuma das doses testadas. Embora o tratamento com a FB tenha alterado, também, o número de transições entre os compartimentos da caixa, o que poderia ser um indicativo de atividade estimulante geral, os dados obtidos no teste do campo aberto eliminaram essa possibilidade, uma vez que o tratamento com FB não alterou os parâmetros registrados neste teste. Portanto, esses resultados sugerem a existência de um efeito tipo-ansiolítico desta fração, desprovido de alterações sobre o comportamento motor dos animais, assim como ausência de efeitos tipo-ansiolíticos da FAR.

No teste da suspensão pela cauda foi observado um resultado geral semelhante ao obtido no teste da transição claro-escuro. O tratamento com a FB do pericarpo de *P. edulis* aumentou significativamente a latência para imobilidade, além de reduzir o tempo total de imobilidade, de maneira comparável ao efeito da imipramina. O tratamento com a FAR, por sua vez, não alterou nenhum dos parâmetros registrados de maneira significativa. Esse resultado sugere a existência de uma atividade tipo-antidepressiva de FB, da mesma forma que o observado para o EA, mas não para a FAR.

Tomados em conjunto, os resultados do fracionamento biomonitorado do EA do pericarpo de *P. edulis*, utilizando os testes da transição claro-escuro e da suspensão pela cauda, indicam que os compostos responsáveis pela atividade neurofarmacológica observada para esta parte da planta estão presentes em maior concentração na FB. Assim, como parte integrante do trabalho de doutorado de Silvana Zucolotto Langassner, e em função dos resultados obtidos em nossos experimentos, foi realizada a investigação fitoquímica tanto do EA quanto da FB e da FAR obtidos a partir do pericarpo de *P. edulis*. Para isso, foi realizada a análise cromatográfica das três preparações utilizando-se tanto a metodologia de cromatografia de camada delgada (CCD), quanto de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os perfis cromatográficos obtidos por meio da análise das três preparações estão representados, a título de informação, no Anexo 1.

A análise cromatográfica dos extratos evidenciou a predominância de uma mistura complexa de compostos com perfil característico de flavonoides do tipo C-glicosídeos. Com base nas

características químicas das substâncias presentes, os quatro principais compostos foram identificados como: **pico 1)** vicenina-2; **pico 2)** 6,8-di-C-glicosilcrisina; **pico 3)** spinosina; e **pico 4)** isoorientina. Como pode ser observado, esses quatro compostos, classificados como flavonoides C-glicosídeos, são os compostos majoritários em EA e em FB. O fracionamento biomonitorado foi realizado de maneira eficaz, uma vez que FB, a qual apresentou os efeitos neurofarmacológicos mais relevantes, contém os compostos presentes em maiores concentrações quando comparada ao EA. Tanto em EA quanto em FB, o composto isoorientina é o composto majoritário. Já a análise da FAR evidenciou apenas a presença de isoorientina, mas em muito menor concentração, não estando presentes os demais flavonoides observados em EA e FB. Esses resultados são bastante relevantes, uma vez que, até o momento, não existiam dados disponíveis na literatura a respeito da composição fitoquímica do pericarpo da espécie. Apenas MARECK e colaboradores (1990) relataram a presença de flavonoides C-glicosídeos no suco dos frutos dessa espécie, bem como no suco industrializado. De maneira interessante, esses autores observaram a predominância da C-glicosilflavona isoorientina em ambos os sucos analisados, *in natura* e industrializado.

Ao interpretar os resultados obtidos – farmacológicos e fitoquímicos – em conjunto, torna-se possível explicar os resultados neurofarmacológicos por nós observados. Considerando que tanto o EA quanto a FB produziram efeitos neurofarmacológicos significativos e que a FAR não apresentou efeito relevante, surgiu a hipótese de que a atividade observada para esta parte da planta pudesse ser produzida pela ação dos flavonoides ausentes na FAR, em conjunto ou isoladamente. Embora ainda não exista um consenso com relação aos compostos responsáveis pela atividade neurofarmacológica da espécie *P. edulis*, alguns autores sugerem que flavonoides C-glicosídeos possam estar envolvidos em tal ação. DE-PARIS e colaboradores (2002) demonstraram uma correlação positiva entre o teor de flavonoides – determinados como vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina – e as ações psicofarmacológicas do extrato das folhas de *P. edulis*. Além disso, ROCHA e colaboradores (2002) sugerem que orientina e isoorientina podem ser responsáveis pelo efeito tipo-ansiolítico da fração butanólica da espécie *Cecropia glaziovii*, o que sugere que os efeitos observados em nosso trabalho podem estar realmente relacionados à presença dos flavonoides identificados no pericarpo de *P.*

edulis. Analisando os resultados fitoquímicos em conjunto com os resultados farmacológicos por nós obtidos, é possível elaborar algumas hipóteses. Uma delas, diz respeito a qual (ou quais) dos compostos podem ser os responsáveis pela atividade neurofarmacológica observada. Tanto o EA quanto a FB obtidos a partir do pericarpo de *P. edulis* apresentaram atividades tipo-ansiolítica e antidepressiva, bem como os mesmos compostos presentes. A FAR, por sua vez, não apresentou os mesmos efeitos biológicos, ao mesmo tempo em que não apresentou os flavonoides vicianina-2, spinosina e 6,8-di-C-glicosilcrisina. Essa observação leva à suposição de que, provavelmente, o conjunto desses três últimos flavonoides poderiam ser os responsáveis pela atividade neurofarmacológica observada, uma vez que, estando ausentes, também está ausente o efeito farmacológico. No entanto, é o flavonoide isoorientina que aparece majoritariamente nos extratos ativos. Assim, não seria possível concluir, sem experimentos adicionais, qual desses compostos seria o provável envolvido na atividade biológica do pericarpo de *P. edulis*. Desta forma, a etapa seguinte desta tese foi investigar a possível ação neurofarmacológica tanto da isoorientina isolada, quanto da fração rica nos demais flavonoides sem a isoorientina (FF). Foram utilizados os mesmos testes empregados na avaliação da FB e da FAR: os testes da transição claro-escuro e da suspensão pela cauda.

O tratamento por v.o. com isoorientina aumentou significativamente o tempo total de permanência dos animais no compartimento claro do modelo, quando comparado ao grupo controle e de maneira semelhante ao observado para o DZP, indicando uma atividade do tipo-ansiolítica para este flavonoide. Já o tratamento com FF não produziu nenhuma alteração significativa nos parâmetros observados no teste da transição claro-escuro. O efeito observado no tratamento com a isoorientina não foi acompanhado por alterações no comportamento locomotor dos animais, evidenciado pela ausência de efeitos nos parâmetros registrados no teste do campo aberto.

O tratamento com a isoorientina também aumentou significativamente a latência para início da imobilidade no teste da suspensão pela cauda, além de reduzir de maneira significativa o tempo total de imobilidade dos animais, de forma similar ao observado no tratamento com imipramina. Já o tratamento com FF se mostrou inativo em ambos os parâmetros observados e em todas as doses testadas, sugerindo mais uma vez que o composto responsável pela atividade tipo antidepressiva poderia ser a isoorientina.

Tais resultados são bastante surpreendentes, considerando a hipótese inicial de que, provavelmente, o conjunto dos flavonoides vicianina-2, spinosina e 6,8-di-*C*-glicosilcrisina poderiam ser os responsáveis pela atividade biológica, uma vez que, ao estarem ausentes na FAR, também estava ausente o efeito neurofarmacológico. No entanto, o observado nos últimos experimentos sugere que o responsável pela atividade neurofarmacológica observada provavelmente é a isoorientina, o composto majoritário identificado nos extratos obtidos a partir do pericarpo de *P. edulis*. Uma possível explicação para a ausência de efeito neurofarmacológico da FAR, mesmo a isoorientina estando presente, pode ser dada em função da sua concentração, ou seja, é provável que ela esteja presente em quantidades insuficientes para iniciar os efeitos biológicos observados no EA e na FB.

Há um número razoável de trabalhos na literatura sobre as propriedades neurofarmacológicas de diferentes flavonoides, inclusive de flavonoides identificados em espécies de *Passiflora*, embora os resultados sejam contraditórios. WOLFMAN e colaboradores (1994) investigaram o efeito neurofarmacológico da crisina, um flavonoide encontrado em *P. coerulea*, e afirmam que este composto possui atividade tipo-ansiolítica, uma vez que aumentou significativamente a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, de maneira semelhante ao DZP. De acordo com os autores, esse efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista específico do sítio benzodiazepínico de receptores GABA, Ro 15-1788, indicando que a crisina é possivelmente um agonista parcial de receptores benzodiazepínicos centrais. ZANOLI e colaboradores (2000) investigaram os efeitos neurofarmacológicos de dois flavonoides, apigenina e crisina, o primeiro isolado de *Matricaria chamomilla* e o segundo de *P. incarnata*. Nesse trabalho, os autores relatam que ambos os compostos apresentaram efeito sedativo, o qual não parece ser decorrente da interação GABA-benzodiazepínica, uma vez que o pré-tratamento com flumazenil não bloqueou esses efeitos. Com relação ao perfil tipo-ansiolítico desses compostos, avaliado no teste da transição claro-escuro, apenas a crisina apresentou este perfil de ação, tendo sido bloqueada por flumazenil, indicando que os efeitos biológicos poderiam ser decorrentes da ativação do sítio benzodiazepínico no receptor GABA_A. Já BROWN e colaboradores (2007) afirmam que a crisina não é o composto ativo de *P. incarnata*, uma vez que não foi capaz de alterar significativamente os parâmetros observados no labirinto em cruz

elevado, embora discutam que a ausência de efeito pode ser decorrente da baixa dose de crisina utilizada. No entanto, esses estudos sobre as possíveis atividades neurofarmacológicas de flavonoides presentes em espécies vegetais psicoativas não dizem respeito a flavonoides do tipo C-glicosídeos, como é o caso da isoorientina.

A isoorientina parece estar presente em diferentes gêneros vegetais, como *Gentiana*, *Rumex*, *Swertia* e *Vitex* (KÜPELI et al., 2004). Embora alguns estudos relacionando as propriedades biológicas de algumas espécies vegetais à presença de isoorientina estejam disponíveis na literatura, a maioria deles são estudos *in vitro* e/ou apenas relatam a presença desse flavonoide no extrato vegetal investigado, sem investigá-la isoladamente (MUN'IN et al., 2003; ORHAN et al., 2003; SEZIK et al., 2005; PARK et al., 2007). Apenas dois trabalhos encontram-se disponíveis a respeito da possível atividade farmacológica do flavonoide C-glicosídeo isoorientina. Um deles (KÜPELI et al., 2004) relata que a isoorientina possui propriedades antinociceptivas e antiinflamatórias nas doses de 15 e 30 mg/kg, sem induzir sinais de toxicidade aguda. Embora existam alguns trabalhos sugerindo que a isoorientina possua atividade antioxidante *in vitro* (KO et al., 1998; CHEEL et al., 2005; MUN'IN et al., 2003; KIM et al., 2006), até o momento existe apenas um trabalho na literatura a respeito da atividade neurofarmacológica deste composto, ainda assim isolado de outra espécie vegetal, *Jatropha cillata* (Okuyama et al., 1996), disponível apenas em língua japonesa e ao qual não tivemos acesso. Outros trabalhos apenas sugerem que a possível presença de isoorientina seja a responsável pelas atividades neurofarmacológicas observadas nos extratos de outras espécies vegetais (ROCHA et al., 2002, 2007), ainda assim de forma especulativa, uma vez que a mesma não foi estudada isoladamente.

Considerando os fatos expostos acima, a última etapa desta tese consistiu em investigar o possível mecanismo de ação neurofarmacológica da isoorientina isolada a partir do pericarpo de *P. edulis*, uma vez que este flavonoide C-glicosilado parece ser o responsável pelas atividades neurofarmacológicas observadas para esta parte da planta.

Primeiramente, foi investigado o possível envolvimento do sistema GABA-benzodiazepínico no efeito tipo-ansiolítico da isoorientina observado no teste da transição claro-escuro, por meio do pré-tratamento com flumazenil, um antagonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Embora o pré-tratamento com

flumazenil tenha bloqueado o efeito ansiolítico do DZP, como era esperado, não foi eficaz em bloquear o efeito da isoorientina. Esse resultado sugere que, possivelmente, o efeito deste flavonoide não seja decorrente de interação com vias de neurotransmissão GABAérgicas ou, pelo menos, não com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A.

Avaliamos, ainda, o possível envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-ansiolítico da isoorientina utilizando o WAY-100635, um antagonista serotoninérgico do receptor 5-HT_{1A}, e a bupiriona como droga-padrão. O pré-tratamento com WAY-100635 bloqueou de maneira significativa o efeito da bupiriona e também da isoorientina no teste da transição claro-escuro. Esse resultado sugere que a via de neurotransmissão serotoninérgica deve estar envolvida no efeito tipo-ansiolítico da isoorientina isolada a partir do pericarpo de *P. edulis*.

De fato, os receptores 5-HT_{1A} parecem desempenhar um importante papel na mediação da neurotransmissão serotoninérgica no sistema nervoso central e alterações em sua funcionalidade estão envolvidas em comportamentos relacionados à ansiedade. A bupiriona e uma série de outros ligantes estruturalmente relacionados aos receptores 5-HT_{1A} têm sido com frequência utilizados na clínica (Wheatley, 1988). A bupiriona, um agonista pleno de receptores 5-HT_{1A} autossômicos e parcial de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos, inibe a atividade do sistema serotoninérgico agindo sobre os autorreceptores e possui atividade tipo-ansiolítica (SHARP et al., 1989). A droga WAY-100635, um antagonista de receptor 5-HT_{1A}, aumenta, portanto, a atividade do sistema serotoninérgico via bloqueio total dos autorreceptores somatodendríticos (COLLINSON e DAWSON, 1997). Em nosso trabalho, o pré-tratamento com WAY-100635 bloqueou o efeito da isoorientina de maneira semelhante à bupiriona, sugerindo que este flavonoide parece estar exercendo sua atividade tipo-ansiolítica via interação com os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}.

O mesmo mecanismo de ação tem sido postulado para outras espécies vegetais, como *Cinnamomum cassia* (YU et al., 2007). Grundmann e colaboradores (2008), entretanto, afirmam que o pré-tratamento com WAY-100635 não foi eficaz em bloquear a atividade tipo-ansiolítica de *P. incarnata* e que o flumazenil, por sua vez, bloqueou esta atividade. A explicação para isso pode estar em uma possível diferença de composição fitoquímica entre as espécies de *Passiflora*, uma vez que não havia sido relatada, ainda, a presença de isoorientina neste gênero.

Por fim, foi investigado o possível envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico na atividade tipo-antidepressiva da isoorientina, utilizando a droga *p*-clorofenilalanina, um inibidor da síntese de serotonina por inibir seletiva e irreversivelmente a triptofano hidroxilase, enzima de síntese de serotonina, e a droga prazosina, um antagonista α_1 -adrenérgico seletivo, também no teste da suspensão pela cauda. O tratamento com *p*-clorofenilalanina bloqueou, como esperado, o efeito antidepressivo da imipramina no teste da suspensão pela cauda, bem como o efeito da isoorientina, indicando que o efeito tipo-antidepressivo deste flavonoide parece ser devido à interação com vias de neurotransmissão serotoninérgicas. O pré-tratamento com prazosina, por outro lado, embora tenha bloqueado os efeitos da imipramina, não bloqueou o efeito da isoorientina, sugerindo que a atividade tipo-antidepressiva desse flavonoide parece não envolver as vias de neurotransmissão noradrenérgicas.

Os dados obtidos nestes últimos experimentos sugerem que a atividade tipo-antidepressiva da isoorientina talvez seja mediada por vias serotoninérgicas de neurotransmissão, de forma semelhante ao observado para sua atividade tipo-ansiolítica. Embora não exista na literatura trabalhos sobre o efeito tipo-antidepressivo da isoorientina isolada, outros flavonoides parecem também exercer seus efeitos via interação com sistemas serotoninérgicos de neurotransmissão. MACHADO e colaboradores (2008), ao investigar os efeitos tipo-antidepressivos da rutina, um flavonoide isolado da espécie *Schinus molle*, observaram que o tratamento com tal composto promovia uma diminuição do tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda, efeito esse que foi bloqueado pelo tratamento com *p*-clorofenilalanina e com AMPT (α -metil-*p*-tirosina), um inibidor da síntese de noradrenalina, sugerindo o envolvimento da serotonina no efeito da rutina. Os flavonoides totais presentes em um decocto herbal chinês, de nome Xiabuxin-Tang, o qual é muito utilizado para o tratamento da depressão, potencializou a resposta de imersão de cabeça induzida por 5-hidroxitriptofano (5-HTP), um precursor metabólico da serotonina, mostrando o envolvimento das vias serotoninérgicas nos efeitos dos flavonoides presentes nesta preparação (AN et al., 2008). Esses autores mostraram ainda que estes flavonoides, cujos compostos majoritários foram identificados e isolados, sendo 22 compostos entre os quais se incluem luteolina, quercetina, apigenina, isoquercitrina e a isoorientina, promoveram a diminuição do tempo total de imobilidade no teste da

suspensão pela cauda, o qual foi bloqueado pelo pré-tratamento com *p*-clorofenilalanina. SANCHEZ-MATEO e colaboradores (2007) também afirmam que o efeito tipo-antidepressivo de uma fração de *Hypericum perforatum*, rica em flavonoides, é mediado por vias serotoninérgicas de neurotransmissão, uma vez que o tratamento com essa fração potencializou os efeitos do 5-HTP em animais experimentais. Por fim, WANG e colaboradores (2008) mostraram que os efeitos hipnosedativos da espécie vegetal *Ziziphi spinosae* estão relacionados à presença do flavonoide C-glicosídeo spinosina. O tratamento com a spinosina aumentou o tempo e diminuiu a latência para o início do sono induzido por barbitúrico e que esse efeito foi potencializado pelo 5-HTP e bloqueado pelo pré-tratamento com *p*-clorofenilalanina, sugerindo que o efeito neurobiológico desse flavonoide ocorra em função da potencialização da neurotransmissão serotoninérgica.

Atualmente, acredita-se que a neurotransmissão serotoninérgica no sistema nervoso central esteja envolvida na patogênese e terapia da ansiedade e da depressão. A diminuição das concentrações cerebrais de serotonina e de seu principal metabólito 5-HIAA são comumente observadas em animais e em pacientes que vivenciam situações de estresse e depressão, sugerindo o envolvimento de uma disfunção no sistema serotoninérgico (RISCH E NEMEROFF, 1992; MITANI et al., 2006). Achados clínicos mostram que muitos agentes terapêuticos atualmente em uso aumentam a disponibilidade de serotonina, a qual apresenta uma relação direta com sua atividade antidepressiva (WILLNER, 1985; BOURIN et al., 2002; DASZUTA et al., 2005). Isso mostra que os resultados obtidos em nosso trabalho, os quais indicam o envolvimento do sistema serotoninérgico nos efeitos tipo-ansiolítico e antidepressivo da isoorientina isolada a partir do pericarpo de *P. edulis*, estão de acordo com as hipóteses atualmente existentes sobre a gênese da ansiedade e da depressão.

Os resultados obtidos nesta tese de doutorado mostram que o pericarpo dos frutos de *P. edulis* apresenta uma relevante atividade neurofarmacológica (ansiolítica e antidepressiva) em animais experimentais e que tal atividade parece estar relacionada à presença do flavonoide isoorientina, a qual parece agir sobre mecanismos cerebrais de neurotransmissão serotoninérgica. As ações dos flavonoides sobre o organismo humano têm gerado inúmeras investigações, as quais mostram que tais compostos possuem numerosas atividades biológicas, como atividade antioxidante, antiinflamatória, estrogênica, antitumoral

citotóxica, entre outras (HARBORNE E WILLIAMS, 2000). Adicionalmente, muitos estudos têm sido dedicados à investigação da atividade neurofarmacológica de flavonoides, embora a maioria seja voltada a investigar as interações existentes entre diferentes flavonoides e as vias de neurotransmissão GABAérgicas (MARDER E PALADINI, 2002; WOLFMAN et al., 2000; ZANOLI et al., 2000). De fato, os estudos sobre os efeitos dos flavonoides no sistema nervoso central somente começaram a surgir nos últimos 20 anos, embora tenham se intensificado apenas na última década (MEDINA et al., 1989; ZANOLI et al., 2000). MEDINA e colaboradores (1989), os quais iniciaram estes estudos, demonstraram a capacidade de alguns flavonoides de se ligar a determinados tipos centrais de receptores GABA-benzodiazepínicos. Somente nos últimos anos é que os efeitos centrais de diferentes flavonoides têm sido associados ao seu envolvimento em sistemas cerebrais de neurotransmissão serotoninérgica (YU et al., 2007; AN et al., 2008; GRUNDMANN et al., 2008; MACHADO et al., 2008; WANG et al., 2008) e talvez isso se deva ao fato de que durante muitos anos as pesquisas sobre mecanismos cerebrais envolvidos em psicopatologias estiveram mais centrados sobre eventos envolvendo o neurotransmissor GABA, o principal neurotransmissor cerebral inibitório, enquanto os estudos envolvendo vias de neurotransmissão serotoninérgica têm crescido exponencialmente nas últimas duas décadas (DEAKIN et al., 1992; DAVIDSON E STANFORD, 1995; GRAEFF et al., 1996; BARNES E SHARP, 1999; SENA et al., 2003; ANDERSON et al., 2008; BELMAKER, 2008; CHRISTMAS et al., 2008; FONE, 2008; BARNES et al., 2009).

Em resumo, nosso trabalho partiu da investigação sobre a possível atividade neurofarmacológica de diferentes partes da espécie *P. edulis*. Os resultados indicaram que o extrato obtido a partir do pericarpo da espécie apresentou um efeito comparativamente maior no teste da HIE, quando comparado ao suco dos frutos e extratos das folhas e raízes, o que nos levou a direcionar a pesquisa para suas possíveis atividades neurobiológicas, principalmente ao considerar que se tratava de uma parte da planta tida como resíduo e desprezada na forma de lixo industrial. Com o auxílio de testes comportamentais, observamos que o pericarpo dos frutos de *P. edulis* apresentou atividade hipno-sedativa, tipo-ansiolítica e tipo-antidepressiva e, por meio de um fracionamento biomonitorado e de análises fitoquímicas, verificamos que os prováveis responsáveis pela atividade biológica observada eram flavonoides do

tipo C-glicosídeos. Tais flavonoides foram identificados, isolados e testados, tendo os resultados obtidos sugerido o envolvimento do flavonoide isoorientina na ação neurofarmacológica observada. Com o auxílio de antagonistas farmacológicos e inibidores de síntese, observamos que o efeito tipo-ansiolítico da isoorientina não parece ser mediado pelo sistema GABA-benzodiazepínico e, sim, por vias serotoninérgicas de neurotransmissão. Seu efeito tipo-antidepressivo também parece ser mediado por vias serotoninérgicas e não noradrenérgicas. No entanto, tais resultados acerca dos mecanismos de ação da isoorientina são preliminares e refletem apenas a possibilidade de interação deste flavonoide C-glicosilado com os sistemas de neurotransmissão investigados e estudos mais específicos são necessários para confirmar este possível mecanismo de ação, além de investigar diretamente a influência deste flavonoide em outros sistemas de neurotransmissão.

Como já mencionado anteriormente, a atividade biológica observada e descrita nesta tese diz respeito a uma parte da planta que é considerada resíduo industrial e, portanto, descartada. As cerca de 300 mil toneladas de cascas dos frutos de *P. edulis* que são descartadas anualmente, além de representar um possível problema para os gestores ambientais, representam um desperdício de material que poderia ser utilizado como matéria-prima para diferentes tipos de indústria, inclusive, ou principalmente, a farmacêutica. O descarte de uma quantidade tão grande de material simboliza um reforço à cultura do desperdício. Segundo diferentes autores, o Brasil é um dos países latino-americanos mais férteis para o cultivo do desperdício, o qual parece estar incorporado à cultura brasileira, ao sistema de produção e a outros sistemas sócio-econômicos. Muitos recursos naturais e financeiros são literalmente atirados na lata do lixo, sem possibilidade de reaproveitamento, provocando perdas na economia, agravando a condição ambiental e diminuindo a disponibilidade de recursos para a população (BORGES, 1991; OLIVEIRA et al., 2002). A proposta de reaproveitamento dos resíduos de certos frutos, principalmente das cascas, como matéria-prima para a produção de outros produtos tem sido uma alternativa que vem ganhando espaço desde o início da década de 70 e é considerada uma proposta plausível e concreta, representando uma excelente fonte de materiais considerados estratégicos para algumas indústrias brasileiras (OLIVEIRA et al., 2002). A indústria farmacêutica é uma dessas indústrias capazes de absorver esses materiais estratégicos,

à medida que a descoberta de potencialidades terapêuticas a partir de resíduos vegetais contribui não só para a agregação de valor aos seus produtos como para a valorização da flora brasileira e do conhecimento tradicional associado.



CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES


Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Os extratos aquosos obtidos a partir das folhas e do pericarpo dos frutos, bem como o suco dos frutos da espécie *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*, apresentam atividade neurofarmacológica, especificamente atividade tipo-ansiolítica, observada no teste da hipertermia induzida por estresse. Comparativamente, em termos de eficácia de ação, o extrato com ação biológica mais proeminente parece ser o obtido a partir do pericarpo dos frutos.
- O extrato aquoso do pericarpo dos frutos de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* apresentou efeitos tipo-ansiolítico, hipno-sedativo e tipo-antidepressivo, sem promover alterações ao comportamento motor dos animais.
- A fração butanólica obtida a partir do extrato aquoso do pericarpo apresentou efeitos tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo, enquanto a fração aquosa residual se mostrou desprovida de efeitos significativos. Uma vez que as doses utilizadas destas frações foram duas vezes menores que a utilizada para o extrato aquoso, concluímos que o processo de fracionamento biomonitorado foi realizado com sucesso e que os compostos envolvidos na atividade biológica observada foram concentrados na fração butanólica.
- A atividade neurofarmacológica observada está relacionada à presença de flavonoides *C*-glicosilados nesta fração, principalmente o composto isoorientina, o qual mostrou-se neurofarmacologicamente ativo quando testado de forma isolada, apresentando efeito tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo.
- A atividade tipo-ansiolítica do flavonoide *C*-glicosídeo isoorientina parece envolver vias de neurotransmissão serotoninérgicas, uma vez que o pré-tratamento com o antagonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} WAY-100635 bloqueou o efeito anteriormente observado. Além disso, o efeito tipo-ansiolítico da isoorientina parece não ser mediado por vias de neurotransmissão GABAérgicas, ou pelo menos não com o

sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, uma vez que o pré-tratamento com flumazenil não bloqueou os efeitos anteriormente observados.

● A atividade tipo-antidepressiva da isoorientina também parece envolver mecanismos de neurotransmissão serotoninérgica, uma vez que o pré-tratamento com p-clorofenilalanina, um inibidor da síntese de serotonina, bloqueou os efeitos tipo-antidepressivos anteriormente observados. Adicionalmente, vias de neurotransmissão noradrenérgicas não parecem estar envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da isoorientina, uma vez que o pré-tratamento com prazosina, um antagonista α_1 -adrenérgico seletivo, não bloqueou tal efeito.

● Em resumo, no presente trabalho, pela primeira vez foi mostrado que o pericarpo dos frutos de *P. edulis*, considerado resíduo e, portanto, descartado, apresenta significativa atividade neurofarmacológica em função dos flavonoides C-glicosilados presentes. Além disso, também foi mostrado pela primeira vez a atividade tipo-antidepressiva para espécies de *Passiflora*, que não havia sido relatada ainda. A atividade neurobiológica do pericarpo está relacionada aos flavonóides C-glicosilados presentes, principalmente o flavonoide isoorientina, o qual parece agir via sistema serotoninérgico de neurotransmissão.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHONDZADEH, S.; KASHANI, L.; MOBASERI, M.; HOSSEINI, S.H.; NIKZAD, S.; KHANI, M. Passionflower in the treatment of opiates withdrawal: a double-blind randomized controlled trial. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 26, p.369-373, 2001a.

AKHONDZADEH, S.; MOHAMMADI, M.R.; MOMENI, F. *Passiflora incarnata* in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. **Therapy**, v.2, n.4, p.609-614, 2005.

AKHONDZADEH, S.; NAGHAVI, H.R.; VAZIRIAN, M.; SHAYEGANPOUR, A.; RASHIDI, H.; KHANI, M. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v.26, p.363-367, 2001b.

AKUTSU, H.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; SANO, K.; HATANAKA, A.; MORI, Y. Alleviating effects of plant-derived fragrances on stress-induced hyperthermia in rats. **Physiol. Behav.**, 75, p.355-360, 2002.

AKUTSU, H.; KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Effects of alpha-pinene odor in different concentrations on stress-induced hyperthermia in rats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.65, n.9, p.1023-1025, 2003.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, 4a. ed., Washington D.C., 1984.

AN, L.; ZHANG, Y.; YU, J.; LIU, X.; ZHAO, N.; YUAN, L.; CHEN, H.; LI, Y. The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. **Prog-Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v.32, n.6, p.1484-1490, 2008.

ANDERSON, I.M.; McKIE, S.; ELLIOTT, R.; WILLIAMS, S.R.; DEAKIN, J.F. Assessing human 5-HT function in vivo with pharmacMRI. **Neuropharmacol.**, v.55, n.6, p.1029-1037, 2008.

ANSSEAU, M. É valuation des paramètres d'activité de gélules d'extrait sec de passiflore selon un modèle "en étoile". **J. Pharm. Belgique**, v.59, n;4, p.97-99, 2004.

ARAÚJO, A.M.; ROSA, M.F.; CRISÓSTOMO, L.A.; FIGUEIRÊDO, M.C.B.; CUNHA, E.A. **Avaliação do potencial de aproveitamento do líquido da casca do coco verde**. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.empraba.br/arquivos/artigo_3102.pdf>. Acesso em 07/04/2008

BARBOSA, P.M.; VALVASSORI, S.S.; BORDIGNON JR., C.L.; KAPPEL, V.D.; MARTINS, M.R.; GAVIOLI, E.C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F.H. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **J. Medicinal Food**, v.11, n.2, 2008.

BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacol.**, v.38, p.1083-152, 1999.

BELMAKER, R.H. The future of depression psychopharmacology. **CNS Spectr.**, v.13, n.8, p.682-687, 2008.

BENINCÁ, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTI, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chem.**, v.104, p.1097-1105, 2007.

BOMBARDELLI, E.; BONATTI, A.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E. M.; MUSTICH, G. Passiflorine, a new glycoside from *Passiflora edulis*. **Phytochem.**, v. 14, n. 12, p. 2661-2665, 1975.

BORGES, R.F. **Panela furada**: o incrível desperdício de alimentos no Brasil, 3 ed. São Paulo: Columbus, 1991.

BORSINI, F.; BRAMBILLA, A.; CESANA, R.; DONETTI, A. The effect of DAU 6215, a novel 5HT-3 antagonist, in animal models of anxiety. **Pharmacol. Res.**, v.27, p.151-164, 1993.

- BORSINI, F.; LECCI, A.; VOLTERRA, G.; MELI, A. A model to anticipatory anxiety in mice? **Psychopharmacol.**, v.98, p.207-211, 1989.
- BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D.J.P. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav. Brain Res.**, v. 164, p. 266-269, 2005.
- BOURIN, M.; DAVID, D.J.; JOLLIET, P.; GARDIER, A. Mechanism of action of antidepressants and therapeutic perspectives. **Thérapie**, v.57, p.385-396, 2002.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **Eur. J. Pharmacol.**, v.463, p.55-65, 2003.
- BOUWKNECHT, J.A.; HIJZEN, T.H.; GUGTEN, J.V.D.; MAES, R.A.A.; OLIVIER, B. Stress-induced hyperthermia in mice: effects of flesinoxan on heart rate and body temperature. **Eur. J. Pharmacol.**, v.400, p.59-66, 2000.
- BOUWKNECHT, J.A.; OLIVIER, B.; PAYLOR, R.E. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model of anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.31, p.41-59, 2007.
- BROWN, E.; HURD, N.S.; McCALL, S.; CEREMUGA, T.E. Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, in the laboratory rat. **ANNA Journal**, v.75, n.5, p.333-337, 2007.
- BRUSCHI, M.L.; CARDOSO, M.L.C.; MILANI, H. Avaliação farmacológica de um extrato de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*. **Rev. Cienc. Farm.**, v.23, n.2, p.263-276, 2002.
- CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.**, v. 14, p.401-418, 2000.

CAPASSO, A.; SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of *Kava kava* and *Passiflora extracts* combination. **Phytomedicine**, v.12, p.39-45, 2005.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharm. Biochem Behav.**, v.75, p.501-512, 2003.

CARLINI, E.A.; CONTAR, J.D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O.F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, v.17, n.1, p.37-64, 1986.

CASTRO, P.C.F.; HOSHINO, A.; SILVA, J.C.; MENDES, F.R. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. **Phytother. Res.**, v.21, p.481-484, 2007.

CHABARIBERY, D.; ALVES, H.S. Produção e comercialização de limão, mamão, maracujá e melancia em São Paulo. **Informações Econômicas**, v. 31, n. 8, p. 43-51, 2001.

CHEEL, J.; THEODULOZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* [DC] Stapf). **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.7, p.2511-2517, 2005.

CHEN, S.W.; MIN, L.; LI, W.J.; KONG, W.X.; LI, J.F.; ZHANG, Y.J. The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.79, p.377-382, 2004.

CHRISTMAS, D.; HOOD, S.; NUTT, D. Potential novel anxiolytic drugs. **Curr. Pharm. Des.**, v.14, n.33, 2008.

CLEMENT, J.A.; YODER, B.J.; KINGSTON, D.G.I. Natural products as a source of CNS-Active Agents. **Mini-Rev. Org. Chem.**, v.1, n.2, p. 183-208, 2004.

COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M.D.; DE LIMA, T.C.M. CUNHA, A.P.

Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 1067-1073, 2006.

COLETA, M.; CAMPOS, M.G.; COTRIM, M.D.; CUNHA, A.P. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. **Pharmacopsych.**, v.34, n.1, p.S20-S21, 2001.

COLLINSON N.; DAWSON, G.R. On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT(1A) agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT(1A) partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT1A antagonist, WAY 100635. **Psychopharmacol. (Berl)**, v.132, p.35-43, 1997.

CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; KASKANTZIS-NETO, G., DE FREITAS, R.J.S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa Degener) obtida por secagem. **B. CEPPA**, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

COSTALL, B.; KELLY, M.E.; NAYLOR, R.J.; ONAIVI, E.S. Actions of buspirone in a putative model of anxiety in the mouse. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.40, p.494-500, 1988.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SANDERS, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v.60, p.52-60, 1997.

CRAWLEY, J.N.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a single animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 13, p. 167-170, 1980.

CRYAN, J.F.; KELLY, P.H.; CHAPERON, F.; GENTSCH, C.; MOMBÉREAU, C.; LINGENHOEHL, K.; FROESTL, W.; BETTLER, B.; KAUPMANN, K.; SPOOREN, W.P. Behavioral characterization of the novel GABAB receptor-positive modulator GS39783 (N,N'-dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine): anxiolytic-like activity without side effects associated with baclofen or benzodiazepines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.310, p.952-963, 2004.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, n. 29, p. 571-625, 2005.

CZUCZWAR, S.J.; FREY, H.H. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. **Neuropharmacol.**, v.25, n. 5, p. 465-469, 1986.

DASZUTA, A.; BAN, S.R.M.; SOUMIER, A.; HERY, M.; MOCAER, E. Depression and neuroplasticity: implication of serotonergic systems. **Thérapie**, v.60, p.461-468, 2005.

DAVIDSON, C.; STAMFORD, J.A. Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} autoreceptors. **Brit. J. Pharmacol.**, v.114, p.1107-1109, 1995.

DE MARCHI, R.; MONTEIRO, M.; BENATO, E.A.; SILVA, C.A.R. Uso da cor da casca como indicador de qualidade do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) destinado à industrialização. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, n.3, p. 381-387, 2000.

DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J. B.; KAPCZINSKI; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmac. Bonaer.**, v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.

DEAKIN, J.F.; GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **5-HT receptor subtypes and the modulation of aversion**. In: MARSDEN, C.A.; HEAL, D.J. (Eds.) Central serotonin receptors and psychotropic drugs. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992, p.147-174.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia**, v.72, p.698-702, 2001a.

DHAWAN, K. KUMAR, S.; SHARMA, A. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. **Fitoterapia**, v.72, p.922-926, 2001b.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *J. Ethnopharm.*, v.78, p.165-170, 2001c.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Supression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. **J. Ethnopharm.**, 81, p.239-244, 2002a.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Reversal of cannabinoids (Δ^9 -THC) by the benzoflavone moiety from methanol extract of *Passiflora incarnata* Linnaeus in mice: a possible therapy for cannabinoid addiction. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.54, n.6, p.875-881, 2002b.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; CHHABRA, S. Attenuation of benzodiazepine in mice by a tri-substituted benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus: a non-habit forming anxiolytic. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.6, n.2, p.215-222, 2003.

DI MARZO, V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v.160, p.1-24, 2008.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **J. Ethnopharm.**, n. 96, p. 371-374, 2005.

DRINGENBERG, H.C.; KORNELSEN, R.A.; PACELLI, R.; PETTERSEN, K.; VANDEWOLF, C.H. Effects of amygdaloid lesions, hippocampal lesions, and buspirone on black-white exploration and food carrying in rats. **Behav. Brain Res.**, v.96, n.1-2, p.161-172, 1998.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 3a. ed. Andrei, São Paulo, pp. 839-840, 1977.

FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D. Global importance of medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. **The Conservation of Medicinal Plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

FLAUSINO JR. O.A.; ZANGROSSI JR., H.; SALGADO, J.V.; VIANA, M.B. Effects of acute and chronic treatment with *Hypericum perforatum* L. (LI 160) on different anxiety-related responses in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.259-265, 2002.

FLAUSINO JR., O.A.; SANTOS, L.A.; VERLI, H.; PEREIRA, A.M.; BOLZANI, V.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiolytic effects of *Erythrina* alkaloids from *Erythrina mulungu*. **J. Nat. Prod.**, v.70, p.48-53, 2007a.

FLAUSINO JR., O.A.; PEREIRA, A.M.; BOLZANI, V.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Effects of Erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, n.2, p.375-378, 2007b.

FONE, K.C. An update on the role of the 5-hydroxytryptamine receptor in cognitive function. **Neuropharmacol.**, v.55, n.6, p.1015-1022, 2008.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Regulation by Dorsal Raphe Nucleus 5-HT Pathways of Two Types of Fear in the Elevated T-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.53, n.1, p.171-177, 1996.

GRICE, I. D.; FERREIRA, L. A., GRIFFITHS, L. R. Identification and simultaneous analysis of harmane, harmina, harmol, isovitexin, and vitexin in *Passiflora incarnata* extracts with a novel HPLC method. **J. Liq. Chromat. Rel. Technol.**, v. 24, n.16, p. 2513-2523, 2001.

GROENINK, L.; PATTIJ, T.; DE JONGH, R.; VAN DER GUGTEN, J.; OOSTING, R.S.; DIRKS, A.; OLIVIER, B. 5-HT_{1A} receptor knockout mice and mice overexpressing corticotropin-releasing hormone in models of anxiety. **Eur. J. Pharmacol.**, v.463, p.185-197, 2003.

GRUNDMANN, O.; KELBER, O.; BUTTERWECK, V. Effects of St. John's Wort extract and single constituents on stress-induced hyperthermia in mice. **Planta Med.**, v.72, p.1366-1371, 2006.

GRUNDMANN, O.; WANG, J.; MCGREGOR, G.P.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. **Planta Med.**, v.74, n.15, p.1769-1773, 2008

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molec. Aspec. Med.**, v.27, p. 1-93, 2006.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochem.**, v.55, p.481-504, 2000.

HARVEY, A.L. Natural product in drug discovery. **Drug Disc. Today**, v.13, n.19/20, p.894-901, 2008.

HASCOËT, M.; BOURIN, M.; NIC DHONNCHADHA, B.A. The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.*, v.25, p.141-166, 2001.

HICKEY, M.; KING, C. **100 Families of flowering plants**. Cambridge University Press: Cambridge, p. 130-133, 1988.

ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 3, p. 718-721, 2006.

JACOBSON, L.H.; CRYAN, J.F. Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. **Behav. Genet.**, v.37, p.171-213, 2007.

KIM, Y.; JUN, M.; JEONG, W.; CHUNG, S. Antioxidant properties of flavone C-glycosides from *Atractylodes japonica* leaves in human low-density lipoprotein oxidation. **J. Food Sci.**, v.70, n.9, p.S575-S580, 2006.

KO, F.N.; CHU, C.C.; LIN, C.N.; CHANG, C.C.; TENG, C.M. Isoorientin-6''-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Gentiana arisanensis*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1389, n.9, p.81-90, 1998.

KOLEWE, M.E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecul. Pharm.**, v.5, n.2, p.243-256, 2008.

KUMAR, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. **Phytother. Res.**, v.20, p.1023-1035, 2006.

KÜPELI, E.; ASLAN, M.; GÜRBÜZ, I.; YESILADA, E. Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientin. **Z. Naturforsch.**, v.59c, p.787-790, 2004.

LECCI, A.; BORSINI, F.; VOLTERRA, G.; MELI, A. Pharmacological validation of a novel animal model of anticipatory anxiety in mice. **Psychopharmacol.**, v.101, n.2, p.255-261, 1990.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v.325, p.161-165, 2009.

LOLLI, L.F.; SATO, C.M.; ROMANINI, C.V.; VILLAS BOAS, L.D.B; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA, R.W. Possible involvement of GABA_A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.111, p.308-314, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 371-374, 2002.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmakochemische Untersuchungen der Drogen der Gattung *Passiflora*. IV. Mittlg: Der Vergleich des Alkaloidgehaltes in verschiedenen Harmandrogen. **Planta Med.**, v. 27, p. 381-384, 1975.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Phytochemical studies of drugs from *Passiflora edulis* Sims. forma *flavicarpa*. **Herba Hungarica**, v. 15, n. 2, p. 7-11, 1976.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B.; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus. II. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa*. **Planta Med.**, v. 27, p. 112-21, 1975.

MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.B.; CUNHA, M.P.; SANTOS, A.R.S.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Eur. J. Pharmacol.**, v.587, p.163-168, 2008.

MALUF, E.; BARROS, H.M.T.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BENTI, R.; LEITE, J.R. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. **Phytother. Res.**, v. 5, n. 6, p. 262-266, 1991.

MARAZZITI, D.; DI MURO, A.; CASTROGIOVANNI, P. Psychological stress and body temperature changes in humans. **Physiol. Behav.**, v.52, n.2, 1992.

MARTINS, L.; SILVA, W.R.; MELETTI, L.M.M. Conservação de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. F. *flavicarpa* DEG.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 183-189, 2005.

MARDER, M.; PALADINI, A.C. GABA_A-receptor ligands os flavonoid structure. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.2, p. 853-867, 2002.

MARECK, U.; GALENSA, R.; HERRMANN, K. Identification of passionfruit juice in fruit products by HPLC. **Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung**, v. 191, n. 4/5 p. 269-274, 1990.

MEDINA, J.H.; PEÑA, C.; LEVI DE STEIN, M.; WOLFMAN, C.; PALADINI, A.C. Benzodiazepine-like molecules, as well as other ligands for the brain benzodiazepine receptors, are relatively common constituents of plants. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.165, n.2, p.547-553, 1989.

MELETTI, L.M.M.; BRÜCKNER, C.H. Melhoria Genética. In: BRÜCKNER, C.H.; PISCANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385, 2001.

MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá: produção e comercialização**. Instituto Agrônomo de Campinas: Campinas. Boletim técnico 181, abril, 1999.

MERLO PICH, E.M.; SAMANIN, R. A two-compartment exploratory model to study anxiolytic/anxiogenic effects of drugs in the rat. **Pharmacol. Res.**, v.21, n.5, p.595-602, 1989.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; KAWAHARA, R. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.30, p.531-534, 2006.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Quim. Nova**, v.24, n.1, 2001.

MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **J. Ethnopharmacol.**, v.109, p.281-288, 2007.

MOWREY, D. Herbal tonic therapies. Keats Publishing Incorporation, New Canaan, CT, 1992.

MUN'IN, A.; NEGISHI, O.; OZAWA, T. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.67, n.2, p.410-414, 2003.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.26, 2007.

NEUMANN, E. Maracujá, “o must”. In: **Brasília Em Dia**. Brasília: Dom Quixote, p. 24, 2005.

NICOLAOU, K.C.; CHEN, J.S.; DALBY, S.M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorg. Med. Chem.**, v.17, p.2290-2303, 2009.

O’CONNOR, K.A.; ROTH, B.L. Screening the receptorome for plant-based psychoactive compounds. **Life Sci.**, v.78, p.506-511, 2005.

OGA, S.; DE FREITAS, P.C.D.; SILVA, A.C.G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Med.**, v. 50, p. 303-306, 1984.

OKUYAMA, E.; OKAMOTO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M. Pharmacologically active components of a Peruvian medicinal plant, *huanarpo* (*Jatropha ciliata*). **Chem. Pharm. Bull (Tokyo)**, v.44, n.2, p.333-336, 1996.

OLIVEIRA, M.M.; CAMPOS, A.R.N.; DANTAS, J.P.; GOMES, J.P.; SILVA, F.L.H. Isotermas de dessorção da casca do maracujá (*Passiflora edulis* Sims): determinação experimental e avaliação de modelos matemáticos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1624-1629, 2006.

OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P.C.N.; RUBACK, V.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para a produção de doce em calda. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, n. 3, p. 259-262, 2002.

OLIVIER B.; BOUWKNECHT, J.A.; PATTIJ, T.; LEAHY, C.; VAN OORSCHOT, R.; ZETHOF, T.J. GABAA-benzodiazepine receptor complex ligands and stress-induced hyperthermia in singly housed mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.72, p.179-188, 2002.

OLIVIER, B.; ZETHOF, T.; PATTIJ, T.; BOOGAERT, M.V.; OORSCHOT, R.V.; LEAHY, C.; OOSTING, R.; BOUWKNECHT, A.; VEENING, J.; GUGTEN, J.V.D.; GROENINK, L. Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. **Eur. J. Pharmacol.**, v.463, p.117-132, 2003.

ONUSIC, G.M.; NOGUEIRA, R.L.; PEREIRA, A.M.S.; FLAUSINO JR., O.A.; VIANA, M.B. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, n.11, p.1538-1542, 2003.

ORHAN, D.D.; ASLAN, M.; AKTAY, G.; ERGUN, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle. **Life Sci.**, v.72, p.2273-2283, 2003.

PARK, H.S.; LIM, J.H.; KIM, H.J.; CHOI, H.J.; LEE, I. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. **Arch. Pharm. Res.**, v.30, n.2, p.161-166, 2007.

PEI, S. Ethnobotanical approaches of traditional medicine studies: some experiences from Asia. **Pharmac. Bot.**, v. 39, p.74-79, 2001.

PETRY, R. D. **Desenvolvimento e validação de métodos de doseamento de flavonóides de *Passiflora edulis* Sims (maracujá)**. Porto Alegre: Curso de Pos-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1999, 114 p. (Dissertação de Mestrado).

PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytother. Res.**, v. 15, n. 2, p. 162-164, 2001.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1978.

PRISINZANO, T.E. Natural products as tools for neuroscience: discovery and development of novel agents to treat drug abuse. **J. Nat. Prod.**, v.72, n.3., p.581-587, 2009.

RAMOS, A.T.; CUNHA, M.A.L.; SABAA-SRUR, A.U.O.; PIRES, V.C.F.; CARDOSO, M.A.A.; DINIZ, M.F.M.; MEDEIROS, C.C.M. Uso de *Passiflora edulis f. flavicarpa* na redução do colesterol. **Rev. Bras. de Farmacog.**, v. 17, n. 4, p.592-597, 2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

REEVES, D.L.; LEVINSON, D.M.; JUSTESEN, D.R.; LUBIN, B. Endogenous hyperthermia in normal human subjects: experimental study of emotional states. **Int. J. Psychosom.**, v.32, n.4, p.18-23, 1985.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Harmanalkaloide in Passiflorae herba? in: MEIER, B. Passiflorae herba-pharmazeutische Qualität. **Zeitschrift für Phytotherapie**, v. 16, p. 90 – 99, 1995.

REIS, J.; PAIVA, P.C.A.; VON TIESENHAUSEN, I.M.E.V.; REZENDE, C.A.P. Composição química, consumo voluntário e digestibilidade de silagens de resíduos do fruto do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) e de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) CV. Cameroon e suas combinações. **Ciênc. Agrotec.**, v. 24, n. 1, p. 213-224, 2000.

REGINATTO, F.H.; DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G.O.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two species of two South Brazilian *Passiflora* species. **Phytother. Res.**, v. 20, p. 348-351, 2006.

RENDLE, A.B. **Classification of flowering plants**. Cambridge University Press: Cambridge, p. 211-213, 1959.

RISCH, S.C.; NEMEROFF, C.B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. **J. Clin. Psychiatry**, v.53, n3-7, 1992.

ROCHA, F. F.; LAPA, A. J.; DE LIMA, T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glaziovii* Sneth in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, p. 183-190, 2002.

ROCHA, F.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M.M.; DE LIMA, T.C.; LAPA, A.J. Antidepressant-like effect of *Cecropia glaziovii* Sneth and its constituents. In vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine** (Stuttgart), v.14, p.396-402, 2007.

SACCO, J.C. Passifloráceas. In: REITZ, R. (Ed) **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí, 132 p., 1980.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Disc. Today**, v.13, n.3/4, p.161-171, 2008.

SÁNCHEZ, C.C. Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behavior of mice in a fully automated two-compartment black and white box. **Pharmacol. Toxicol.**, v.77, n.1, p.71-78, 1995.

SÁNCHEZ, C.C. 5-HT(1A) receptors play an important role in modulation of behavior of rats in a two-compartment black and white test box. **Behav. Pharmacol.**, v.7, n.8, p.788-797, 1996.

SÁNCHEZ, C.C. Acute stress enhances anxiolytic-like drug response of mice tested in a black and white test box. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.7, n.4, p.283-288, 1997.

SÁNCHEZ-MATEO, C.C.; BONKANKA, C.X.; PRADO, B.; RABANAL, R.M. Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, p.115-121, 2007.

SANTOS, K.C.; KURTZ, S.M.T.F.; MÜLLER S.D.; BIAVATTI, M.W.; OLIVEIRA, R.M.M.W.; SANTOS, C.A.M. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.49, n.4, p. 565-573, 2006.

SANTOS, K.C.; SANTOS, C.A.M. OLIVEIRA, R.M.W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p.306-309, 2005.

SATO, G.S.; CHABARIBERY, D.; BESSA JR., A.A. Panorama da produção e de mercado do maracujá. **Informações Econômicas**, v. 22, n. 6, p. 17-31, 1992.

SCHUSTER, B.G. A new integrated program for natural product development and the value of an ethnomedical approach. **J. Altern. Complement. Med.**, v.7 (Suppl. 1), p. S61 – S72, 2001.

SEAFORTH, C.E.; ADAMNS, C.D.; SYLVESTER, Y. A Guide for Medicinal Plants of Trinidad & Tobago. Commonwealth Secretariate, Marlborough House, Pall Mall, London, 1983.

SENA, L.M.; BUENO, C.; POBBE, R.L.H.; ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI JR., H.; VIANA, M.B. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. **Behav. Brain Res.**, v.142, p.125-133, 2003.

SEZIK, E.; ASLAN, M.; YESILADA, E.; ITO, S. Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. **Life Sci.**, v.76, p.1223-1238, 2005.

SHARP T.; BRAMWELL, S.R.; GRAHAME-SMITH, D.G. 5-HT₁ agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. **Br. J. Pharmacol.**, v.96, p.283–90, 1989.

SHINOMIYA, K.; INOUE, T.; UTSU, Y.; TOKUNAGA, S.; MASUOKA, T.; OHMORI, A.; KAMEI, C. Hypnotic activities of Chamomile and *Passiflora* extracts in sleep-disturbed rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v.28, n.5, p.808-810, 2005.

SLATTERY, D.A.; HUDSON, A.L.; NUTT, D.J. Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.18, n.1, p.1-21, 2004.

SOUZA, F.G.; OLIVEIRA, M.E.S.A.; MENEZES, M.D.; VIROLI, S.L.M.; SOUZA NETO, M.A. Avaliação da qualidade do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) comercializado em Paraíso – TO. Disponível em: <[http://www.ulbra-to.br/eventos/congresso2005/\(S\(541dlh55rduzux55xevwtj45\)\)/doc/artigo.aspx?aid=475&AspxAutoDetectCookieSupport=1](http://www.ulbra-to.br/eventos/congresso2005/(S(541dlh55rduzux55xevwtj45))/doc/artigo.aspx?aid=475&AspxAutoDetectCookieSupport=1)>. Acesso em: 5/12/2007.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioral effects of *P. incarnata* L and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **J. Ethnopharmacol.**, v.57, p.11-20, 1997.

SPENCER, K.C.; SEIGLER, D.S. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 31, p. 794-796, 1983.

SPERONI, E.; BILLI, R.; MERCATI, V.; BONCOMPAGNI, E.; TOJA, E. Sedative effects of crude extract of *Passiflora incarnata* after oral administration. *Phytother. Res.*, v.10, p.S-92-S-94, 1996.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extract from *P. incarnata*. **Planta Medica**, v. 54, p. 488-491, 1988.

SPOOREN, W.P.J.M.; SCHOEFFTER, P.; GASPARINI, F.; KUHN, R.; GENTSCH, C. Pharmacological and endocrinological characterisation of stress-induced hyperthermia in singly housed mice using classical and candidate anxiolytics (LY314582, MPEP and NKP608). **Eur. J. Pharmacol.**, v.435, p.161-170, 2002.

STÉRU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacol.**, v. 85, p. 367-370, 1985.

SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 106, n. 3, p. 319-330, 1952.

TALLMAN, J.F.; GALLAGER, D.W.; MALLORGA, P.; THOMAS, J.W.; STRITMATTER, W.; HIRATA, F.; AXELROD, J. Studies on benzodiazepine receptors. **Advanc. Biochem. Psychopharmacol.**, v.198, n.21, p.277-283, 1980.

VALLE, N.B.; LEITE, J.R. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). **Ciência e Cultura**, v. 35, p. 11-24, 1983.

VAN DER HEYDEN, J.A.M.; ZETHOF, T.J.J.; OLIVIER, B. Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. **Physiol. Behav.**, v.62, n.3, p.463-470, 1997.

VIEIRA, R.A. Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayenensis* (gervão-roxo). Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado. 2001.

VINKERS, C.H.; BOGAERT, M.J.; KLANKER, M.; KORTE, S.M.; OOSTING, R.; HANANIA, T. Translational aspects of pharmacological research into anxiety disorders: the stress-induced hyperthermia (SIH) paradigm. **Eur. J. Pharmacol.**, v.585, p.407-425, 2008.

VINKERS, C.H.; JONG, N.M.; KALKMAN, C.J.; WESTPHAL, K.G.C.; OORSCHOT, R.V.; OLIVIER, B.; KORTE, S.M.; GROENINK, L. Stress-induced hyperthermia is reduced by rapid-acting anxiolytic drugs independent of injection stress in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.93, p.413-418, 2009a.

VINKERS, C.H.; KLANKER, M.; GROENINK, L.; KORTE, S.M.; COOK, J.M.; LINN, M.L.V.; HOPKINS, S.C.; OLIVIER, B. Dissociating anxiolytic and sedative effects of GABA_Aergic drugs using temperature and locomotor responses to acute stress. **Psychopharmacol.**, v.203, p.299-311, 2009b.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S.E.; WHISTLER, J.L. Opioid receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, v.73, p.953-990, 2004.

WANG, L.E.; BAI, Y.J.; SHI, X.R.; CUI, X.Y.; ZHANG, F.; ZHANG, Q.Y.; ZHAO, Y.Y.; ZHANG, Y.H. Spinosin, a C-glycoside flavonoid from semen *Ziziphi spinosae*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.90, n.3, p.399-403, 2008.

WHEATLEY, D. Use of anti-anxiety drugs in the medically ill. **Psychother. Psychosom.**, v.49, p.63-80, 1988.

WILLNER, P. Antidepressants and serotonergic neurotransmission: an integrative review. **Psychopharmacol. (Berl)**, v.85, p.387-404, 1985.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. **Pharm. Biochem. Behav.**, v.47, n.1, 1994.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1229-1234, 2000a.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1377-1380, 2000b.

YU, H.S.; LEE, S.Y.; JANG, C.G. Involvement of 5-HT_{1A} and GABAA receptors in the anxiolytic-like effects of *Cinnamomum cassia* in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.87, n.1, p.164-170, 2007.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v.71, p.S117-S123, 2000.

ZETHOF, T.J.; VAN DER HEYDEN, J.A.; TOLBOOM, J.T.; OLIVIER, B. Stress-induced hyperthermia in mice: a methodological study. **Physiol. Behav.**, v.55, n.1, p.109-115, 1995.

ZUCOLOTTO, S. M., GOULART, S., MONTANHER, A. B., REGINATTO, F. H., SCHEKEL, E. P., FRODE, T. S. Bioassay-guided

isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Med.**, v. 75, p. 1-6, 2009.

ZUCOLOTTO, S. M.; PALERMO, J. A.; SCHENKEL, E. P. Estudo fitoquímico das raízes de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Degener. **Acta Farmac. Bonaer.**, v. 25, v.1, p. 5-9, 2006.

ANEXO 1

Perfis cromatográficos obtidos por meio da análise fitoquímica do extrato aquoso (A), da fração butanólica (B) e da fração aquosa residual (C) obtidos a partir do pericarpo de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*.

